UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG UND KINETIK DER GLUTATHION PEROXIDASE (E.C.1.11.1.9.) IN DEN GEWEBEN DES AUGES BEI VERSCHIEDENEN TIERARTEN

vorgelegt von
Manuela Christiane Koch
aus Marburg an der Lahn

Marburg 1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552319_0060

Dissertationsdruck
Blasaditsch GmbH ▪ 89 Augsburg 17 ▪ Theodor-Heuß-Platz 3 ▪ Telefon (0821) 51 85 63

AUS DER UNIVERSITÄTS-AUGENKLINIK MARBURG A.D.LAHN
DIREKTOR: PROFESSOR DR.MED. DR.H.C. W. STRAUB

UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG UND KINETIK DER GLUTATHION PEROXIDASE (E.C.1.11.1.9.) IN DEN GEWEBEN DES AUGES BEI VERSCHIEDENEN TIERARTEN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN MEDIZIN
DES FACHBEREICHS HUMANMEDIZIN

VORGELEGT VON
MANUELA CHRISTIANE KOCH
AUS MARBURG AN DER LAHN

MARBURG 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am
26. September 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Humanmedizin

Dekan : Prof.Dr.med.H. Oepen

Referent : Prof.Dr.med.M. Reim

Correferent: Prof.Dr.med.Dr. hc.W. Straub

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ASC	Ascorbinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
t-Bhp	tert. Butylhydroperoxid
DHA	Dehydroascorbinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
Gl I	Glyoxalase I
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxydiert
GSH-POD	Glutathion Peroxidase
HMP-Shunt	Hexose-Monophosphat-Shunt
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
Hu-CE	Hundecorneaepithel
i.T.	im Test
Ka-CE	Katzencorneaepithel
Kan-CE	Kaninchencorneaepithel
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
M	Mittelwert
MGO	Methylglyoxal
n	Anzahl der Messungen
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxydiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
6-PG	6-Phosphogluconat
6-PGDH	6-Phosphogluconatdehydrogenase
PPZ	Pentose-Phosphat-Zyklus
R-5-P	Ribulose-5-Phosphat
RCE	Rindercorneaepithel
SCE	Schweinecorneaepithel
s_m	Standardabweichung der Meßreihe

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

I. EINLEITUNG 1

1. Glutathion Peroxidase 1
1.1. Ansätze der Glutathion Peroxidase-Forschung 1
1.2. Entdeckung und Anreicherung des Enzyms 1
1.3. Eigenschaften des Enzyms 1
1.3.1. Molekulargewicht 1
1.3.2. pH-Abhängigkeit 2
1.3.3. Substratspezifität 2
1.3.4. Selengehalt 2
1.3.5. Kinetische Eigenschaften 3
1.4. Bestimmungsmethoden der Glutathion Peroxidase 4
1.5. Verteilung der Glutathion Peroxidase im Organismus 6

2. Glutathion 6
2.1. Ansätze der Glutathion-Forschung 6
2.2. Glutathion in der Cornea 7
2.3. Glutathion in der Linse 10

II. ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT 12

III. METHODEN 13

1. Die verwandten Geräte und Chemikalien 13
2. Gewinnung des Materials 15
2.1. Rinder- und Schweineaugen 15
2.2. Hunde- und Katzenaugen 15
2.3. Kaninchenaugen 15
3. Präparation der Gewebe 16
3.1. Corneaepithel 16
3.2. Conjunctiva 16
3.3. Linse 17
3.4. Retina 17
4. Homogenisierung der Gewebe 18
5. Bestimmungsmethoden 19
5.1. Aktivitätsbestimmung der Glutathion Peroxidase 19
5.2. Kinetische Untersuchungen der Glutathion Peroxidase 21

SEITE

5.3. Konzentrationsbestimmung des tert.-Butylhydroperoxids 22
5.4. Konzentrationsbestimmung des reduzierten Glutathions 23
5.5. Quantitative Proteinbestimmung in den verschiedenen Geweben des Auges 25
6. Berechnung der Einzelwerte 26
7. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse 26
IV. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG 28
1. Ergebnisse zur Standardisierung des gekoppelt-enzymatischen Testes 28
2. Ergebnisse zur kinetischen Untersuchung der Glutathion Peroxidase 35
3. Ergebnisse zur Reihenaktivitätsmessung der Glutathion Peroxidase in den verschiedenen Geweben des Auges und Literaturvergleich 43
3.1. Rind 43
3.1.1. Corneaepithel 43
3.1.2. Linse 43
3.2. Schwein 45
3.2.1. Corneaepithel 45
3.2.2. Linse und Retina 45
3.3. Hund und Katze 45
3.4. Kaninchen 50
4. Ergebnisse der Proteinbestimmung 50
4.1. Rind 51
4.2. Schwein 51
4.3. Hund 53
4.4. Kaninchen 53
4.5. Katze 54
V. DISKUSSION 55
1. Methodische Betrachtungen 55
1.1. Zur Präparation der Gewebe 55
1.2. Zur Standardisierung des Testes 56
1.2.1. Glutathion 56
1.2.2. t-Bhp 57

SEITE

1.3. Zum Literaturvergleich 58
2. Biologische Fragestellungen 60
2.1. Leber 60
2.2. Erythrozyt 61
2.3. Auge 63
VI. ZUSAMMENFASSUNG 67
VII. LITERATURVERZEICHNIS 68
VIII. EINZELWERTTABELLEN 84

I. E I N L E I T U N G

1. Glutathion Peroxidase

1.1. Ansätze der Glutathion Peroxidase Forschung

Die Glutathion Peroxidase (E.C. 1.11.1.9.) wird seit 13 Jahren mit ständig wachsendem Interesse untersucht. Die Gründe dafür sind darin zu sehen, daß sich nach den bisherigen Ergebnissen über das Enzym eine Möglichkeit abzeichnet, einige pathophysiologische Phänomene aus den Bereichen der Hämatologie und Ophthalmologie leichter erklären zu können. (30)

1.2. Entdeckung und Anreicherung des Enzyms

Die GSH-POD wurde 1957 von MILLS (88) in den Rindererythrozyten entdeckt mit seiner Fähigkeit, Hämoglobin vor oxidativem Abbau zu schützen. 1967 beschrieben SCHNEIDER und FLOHÉ (116) eine Methode zur Präparation der GSH-POD aus Rindererythrozyten. 1970 gelang FLOHÉ et al. (41) erstmals die Reindarstellung des Enzyms.

Es gibt somit neben der Catalase ein weiteres Enzym, das in Anwesenheit von Glutathion die oxidative Zerstörung von Hämoglobin durch H_2O_2 verhindern kann.

Das Enzym GSH-POD katalysiert die Reaktion

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O.$$

1.3. Eigenschaften des Enzyms

1.3.1. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mit drei voneinander unabhängigen Methoden (30,41,116) um 84ooo bestimmt. HOLMBERG (64) gab aus Rinderaugenlinsen einen Wert von 96ooo an.

1.3.2. pH-Abhängigkeit

pH-Werte unter 6 werden nur kurzfristig, solche unter 5 überhaupt nicht toleriert. Das Enzym ist instabil in Lösung, empfindlich gegen Bestrahlung und höhere Temperaturen. Die GSH-POD zeigt ein scharfes Aktivitätsoptimum bei etwa einem pH-Wert von 8.8.(45).

1.3.3. Substratspezifität

Im Gegensatz zu anderen Peroxidasen ist die GSH-POD hochspezifisch im Hinblick auf das Donorsubstrat. FLOHÉ et al. (42) machten dazu eingehende Spezifitätsstudien. Im Hinblick auf die Peroxide scheint sich das Enzym völlig unspezifisch zu verhalten, wie FLOHÉ et al. (42), HOLMBERG (64), LITTLE und O'BRIEN (80) aufzeigten. Zum Beispiel werden nach den genannten Autoren Linolsäurehydroperoxid, Cumolhydroperoxid und tert. Butylhydroperoxid gleich schnell wie H_2O_2 durch die GSH-POD abgebaut.

Die von der GSH-POD katalysierte Reaktion kann demnach allgemeiner formuliert werden:

$$R - OOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + R\text{-}OH + H_2O$$

1.3.4. Selengehalt

FLOHÉ, GÜNZLER und SCHOCK (36) fanden 1973, daß die GSH-POD 4 Gramm-Atome Selen pro Mol Enzym enthält.

Hinweise dafür haben bereits ROTRUCK et al. (111) 1972 gegeben, als sie in Experimenten ermittelten, daß Selen in den GSH abhängigen Metabolismus der Hydroperoxide eingreift. Aus den Versuchen wurde gefolgert, daß Selen ein essentieller Bestandteil der GSH-POD ist, da ein Selendefizit die GSH-POD Aktivität sinken ließ.

Aus der Feststellung, daß die GSH-POD ein selenhaltiges Enzym ist, mögen manche Befunde bei Selendefizit zu erklären sein, beispielsweise die ungenügende Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren an biologischen Membranen.

TAUSSKY et al. (118) machten 1966 Untersuchungen zum Selengehalt im Auge von Mensch und Tier. Sie fanden einen abnehmenden Selengehalt von der Iris über die Retina, Linse, Sklera, Cornea und das Kammerwasser.

Nach ROTRUCK et al. (111) stehen niedrige GSH-POD Werte und niedrige Selenwerte in Korrelation zueinander.

1.3.5. Kinetische Eigenschaften

Da keine Sättigung des Enzyms mit Donorsubstrat auftritt und die Affinität zum Peroxid hoch ist (112), zeigt die GSH-POD die Eigenschaften aller anderen Peroxidasen. Kinetische Messungen des Enzyms führten SCHNEIDER und FLOHÉ (116) an angereichertem Enzym aus. Etwa gleichzeitig versuchten PAGLIA und VALENTINE (97), aus Hämolysat kinetische Eigenschaften zu bestimmen.

Sowohl COHEN und HOCHSTEIN (16) als auch SCHNEIDER und FLOHÉ (116), sowie LITTLE und O'BRIEN (79) sprachen sich für eine Reaktionskinetik erster Ordnung für das Donorsubstrat aus. Dem entgegen stehen Ergebnisse von PAGLIA und VALENTINE (97), HOCHSTEIN und UTLEY (62) sowie von REIM und HEUVELS (105). Sie fanden nämlich eine GSH-Sättigung des Enzyms. Allerdings führten diese Arbeitsgruppen ihre kinetischen Messungen mit dem gekoppelt-enzymatischen Test durch. FLOHÉ und BRAND (34) führten die Ergebnisse mit diesem Test

auf methodische Unzulänglichkeiten zurück. Diese Autoren zeigten dann in der gleichen Untersuchung eindeutig, daß eine lineare Proportionalität von Umsatzrate und Donorsubstratkonzentration auch bei hohen Substratkonzentrationen besteht. Diese Ergebnisse für die GSH-POD aus Rindererythrozyten wurden von FLOHÉ, SCHLEGEL, SCHAICH (38) bestätigt. Entsprechende kinetische Eigenschaften wiesen sie auch für das Enzym aus Rattenblut und -leber nach. HOLMBERG (64) machte die gleiche Beobachtung für das angereicherte Enzym aus Rinderaugenlinsen.

Nicht so fundiert sind die Angaben über die Michaelis-Menten-Konstante für H_2O_2: PAGLIA und VALENTINE (97) geben einen K_m (H_2O_2)-Wert von 2.5×10^{-5} M bei einer 5 mM GSH-Konzentration für die GSH-POD aus menschlichen Erythrozyten an. Die Messungen erfolgten mit dem gekoppelt-enzymatischen Test. REIM und HEUVELS (105) erhielten mit der gleichen Methode einen K_m (H_2O_2)-Wert von 0.01×10^{-3} M bei einer 4 mM GSH-Konzentration aus der Cornea von Rind und Kaninchen.

FLOHÉ und BRAND (33), FLOHÉ, SCHLEGEL, SCHAICH (38) fanden wesentlich niedrigere K_m (H_2O_2)-Werte sowohl für das Rinder- als auch das Rattenenzym (1×10^{-6} bzw. $2\text{-}3 \times 10^{-6}$ M bei 37° C und 1×10^{-4} M GSH).

1.4. Bestimmungsmethoden der Glutathion Peroxidase

In der Literatur werden zur Bestimmung der GSH-POD Aktivität zahlreiche Methoden angegeben. Aus diesem Grunde sind die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen quantitativ schlecht miteinander zu vergleichen.

Aus verschiedenen Gründen hat die Aktivitätsbestimmung der GSH-POD Schwierigkeiten bereitet. Erstens reagieren die beiden Substrate des Enzyms nicht enzymatisch miteinander, zweitens reagiert jedes Substrat für sich mit einer Menge von Substanzen aus biologischem Material. FLOHE und BRAND (34) wiesen außerdem darauf hin, daß die Aktivität des Enzyms durch die Testzusammensetzung (Art und Konzentration der Anionen) beeinflußt wird. Darüber hinaus können pH-Schwankungen des Mediums zu Störungen bei der Aktivitätsmessung führen(64,90,116).

Die erste Aktivitätsmessung für die GSH-POD führte MILLS 1957 (88) durch; diese Methode wird jedoch nicht mehr angewandt. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche bessere Methoden zur Aktivitätsmessung beschrieben, von denen jedoch nur die polarographische (29,34,116) und die enzymatische Bestimmung der GSH-POD (97) von bleibendem Interesse sind.

Dabei ist die polarographische Analyse mehr für die Untersuchungen am isolierten Enzym geeignet, da sie von verschiedenen Ionen besonders von Halogeniden gestört wird. Der große Vorteil dieses Analysenverfahrens besteht jedoch darin, daß bei dem dabei verwandten niedrigen pH der Analysenlösung die sonst reaktionsfreudigen Substrate nebeneinander stabil sind (29).

Der optische Test nach PAGLIA und VALENTINE (97) ist dagegen eher für ungereinigtes Material geeignet.

1.5. Verteilung der Glutathion Peroxidase im Organismus

Bisher konnte die GSH-POD mit Sicherheit nur im Säugetier nachgewiesen werden (28).

MILLS untersuchte bereits 1960 (91) die Organverteilung der GSH-POD bei der Ratte. Die höchste spezifische Aktivität fand er in der Leber, mittlere Aktivitäten wurden im Erythrozyten und Herzen, sowie in Lunge und Niere gemessen. Intestinaltrakt und Skelettmuskulatur zeigten nur geringe Aktivitäten.

PIRIE wies 1965 (99) die GSH-POD in Augenlinsen von Rind, Kaninchen und Meerschweinchen nach. ANDERSON und SPECTOR (3) gelang 1971 der Nachweis des Enzyms in der Rindercornea, HEUVELS (59) wies darüber hinaus 1973 die GSH-POD auch in der Linse und Retina vom Rind sowie in der Cornea, Linse und Conjunctiva vom Kaninchen nach.

HOLMBERG (64) zeigte ferner, daß sich die spezifische Aktivität in Epithel, Rinde und Kern der Rinderaugenlinse annähernd gleich verhält.

2. Glutathion

2.1. Ansätze der Glutathion-Forschung

Glutathion wurde bereits 1888 von de REY PAILHADE (110) entdeckt und von HOPKINS 1921 (65) wiederentdeckt und aus Hefe isoliert.

GSH ist in den Zellen des lebenden Organismus allgemein verbreitet. Seine physiologische Bedeutung beruht auf seiner Eigenschaft als Redoxsystem, das nach dem Prinzip der reversiblen Bindung zweier GSH-Moleküle über eine Disulfidbrücke arbeitet.

Über die mannigfaltigen Wirkungen des GSH in biochemischen Vorgängen wurde seit seiner Entdeckung intensiv gearbeitet. Die Schutzwirkung von GSH in lebendem Gewebe gegenüber lebenswichtigen Stoffen, wie Ascorbinsäure, spielt über die physiologische Bedeutung hinaus eine Rolle bei toxischen Vorgängen verschiedenster Aetiologie.

Über hämolytische Anämien mit einem Mangel an reduziertem GSH in den Erythrozyten berichteten sowohl BEUTLER 1959 (7) als auch LÖHR und WALLER 1961(82). Ein Modell, das das GSH als wichtigen Faktor in ein Reaktionsschema zum Aminosäuretransport durch die Zellmembran einordnet, wurde von MEISTER 1973 (87) veröffentlicht.

2.2. Glutathion in der Cornea

Durch Untersuchungen der Enzyme und Metabolitgehalte des energieliefernden Stoffwechsels der Cornea von REIM, SCHMIDT, MEYER (108) wurde gezeigt, daß ein großer Teil der bereitgestellten Energie nur zur Aufrechterhaltung der Transparenz und gleichmäßigen Dicke dieses Gewebes dient (21).

Mehrere Autoren bewiesen, daß in den verschiedenen Strukturen der Cornea die notwendigen Enzyme, Coenzyme und Substrate für die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus und den Pentose-Phosphat-Zyklus vorhanden sind (22,57,106,107). Darüber hinaus wurde festgestellt, daß das Glutathion eine besondere Rolle im Stoffwechsel der Cornea spielt. Es wurde von HERRMANN und MOSES (58), ANDERSON und SPECTOR (3), REIM, BEERMANN und LUTHE (109), REIM und ASHAUER (102) in hohen Konzentrationen in der Cornea bestimmt.

Man hat zwar in diesem Gewebe die Gluathion-synthese noch nicht nachweisen können, aber die Bedeutung des GSH innerhalb enzymatischer Prozesse, die zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der Cornea und damit ihrer Transparenz notwendig sind, darf als gesichert gelten.

Man kann davon ausgehen, daß in der Cornea ähnlich wie im Erythrozyten ein besonderes System besteht, das das Glutathion in dem reduzierten Zustand erhält.

Die wichtigsten Substrate und Enzyme für ein solches System sind bisher alle in der Cornea nachgewiesen worden. HENNIGHAUSEN (56) wies zusätzlich zu den Enzymen der Glykolyse und des PPZ die Glutathion-Reduktase nach. Durch ANDERSON und SPECTOR (3), REIM und HEUVELS (105) erfolgte der Nachweis der GSH-POD. Die Aktivitäten der Enzyme reichen aus, um größere Mengen der Substrate umzusetzen.

LUTHE (85) kommt in seiner Arbeit zu dem Schluß, daß dieses Reaktionssystem wie im Erythrozyten, durch welches das GSH im reduzierten Zustand gehalten wird, aus folgenden Teilen besteht:

In den ersten beiden Reaktionen des Pentose-Phosphat-Zyklus, die durch die Enzyme G-6-PDH und 6-PGDH katalysiert werden, wird NADPH geliefert. Dieser Cofaktor reagiert dann mit der oxidierten Form GSSG des Tripeptids GSH, um zum reduzierten Glutathion zu führen. Dieser letzte Schritt wird von dem Enzym Glutathion-Reduktase katalysiert. GSH dient dann weiter als Substrat für die Reaktion der GSH-POD.

Die Abbildung 1 zeigt dieses System der ineinandergreifenden Reaktionen, das fähig ist, in Zusammenarbeit mit dem Glucosemetabolismus das GSH im reduzierten Zustand zu halten.

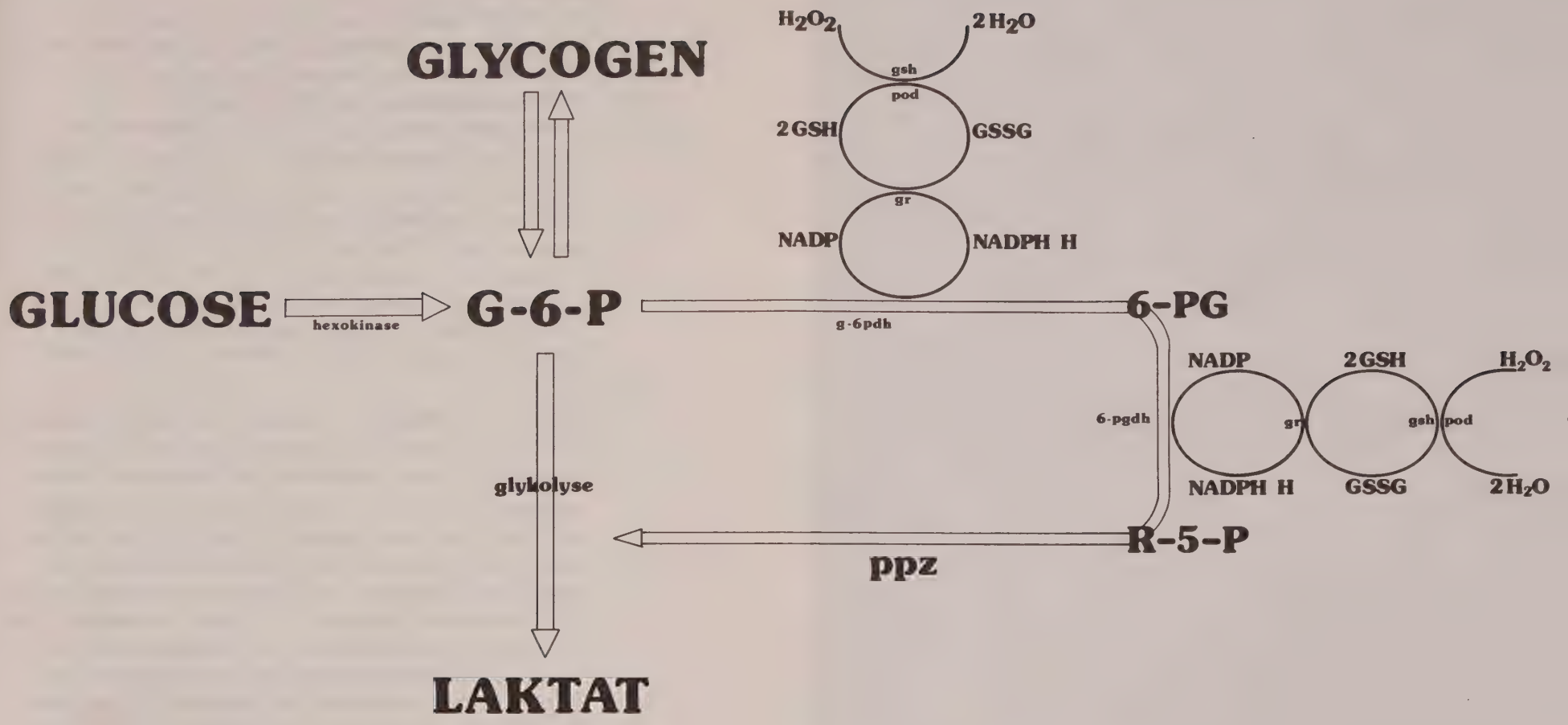


Abb. 1: Reaktionsschema zur Verdeutlichung der Verbindung des Glutathionsystems mit dem Glucosemetabolismus.

2.3. Glutathion in der Linse

Der Stoffwechsel der Linse hat die Aufgabe, die Transparenz des Gewebes zu erhalten. Die dazu benötigte Energie wird zum größten Teil aus der Glykolyse gewonnen, der PPZ ist nur mit 20 % am Glucoseabbau beteiligt. Der Zitronensäurezyklus spielt im Linsenstoffwechsel praktisch keine Rolle.

Neben den Enzymen der Glykolyse (20) wurde bereits 1924 von GOLDSCHMIDT (49) in der Linse Glutathion nachgewiesen. EULER und MARTIUS (25) führten die ersten genauen Gehaltsanalysen durch, die von zahlreichen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Ergebnissen wiederholt wurden. Ausführliche Zusammenstellungen machten darüber NORDMANN (95) und KUCK (77).

KINSEY und MERRIAM (73) zeigten, daß Linsenkulturen in vitro aus den drei Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure und Cystein Glutathion synthetisieren können.

Auf die Bedeutung des GSH-Spiegels für die Transparenz der Linse wies KINOSHITA 1964 (72) hin. Es besteht demnach eine direkte Beziehung zwischen der Transparenz der Linse und ihrem Gehalt an Glutathion. Der extrem hohe GSH-Gehalt - 10 mM - (er beträgt das looofache des GSH-Gehaltes des Kammerwassers) in der sonst so stoffwechselträgen Linse ist demnach verständlich. Untersuchungen an getrübten Linsen ergaben, daß das Ausmaß der Linsentrübung direkt proportional zu einer verminderten GSH-Konzentration war (21).

Wie schon in I. 2.2. erwähnt, existiert im Erythrozyten ein System, das das Glutathion in seinem reduzierten Zustand erhält; dieses System ist abhängig vom PPZ. Fällt der GSH-Spiegel im Erythrozyten -z.B. durch einen G-6PDH-Mangel - so kommt es zu hämolytischen Krankheitsbildern.

Der PPZ liefert auch in der Linse das nötige NADPH, damit das oxidierte Glutathion mit Hilfe der Glutathion-Reduktase in seinen reduzierten Zustand zurückgeführt werden kann. Hämolyse ist das Ergebnis eines Absinkens des GSH-Spiegels im Erythrozyten; die Verflüssigung oder Trübung des Linsengewebes wäre eine vergleichbare Situation in der Linse (72).

II. ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT

Aus den letzten beiden Kapiteln geht hervor, daß das Glutathion und die Glutathion Peroxidase wahrscheinlich einen bisher in allen seinen Einzelheiten noch nicht geklärten Stellenwert im Metabolismus der Cornea und der Linse einnehmen.

Da die GSH-POD in den Geweben des Auges bisher nur von wenigen Autoren (3,99,105) bestimmt und von diesen wiederum keine gut reproduzierbare Methode zur Aktivitätsbestimmung des Enzyms beschrieben wurde, soll diese Arbeit einen Beitrag hierzu leisten.

Mit der ausgearbeiteten Methode wird dann auch die Enzymaktivität einiger Gewebe des Auges bei verschiedenen Tierarten in Reihenuntersuchungen bestimmt.

Außerdem sollen eine kinetische Untersuchung des Enzyms mit der gleichen Methode versucht und alle hier verwendeten Gewebe des Auges auf ihren Proteingehalt geprüft werden.

III. METHODEN

1. Die verwandten Geräte und Chemikalien

Photometer Eppendorf:	Fa. Netheler & Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel; mit Registriereinrichtung und Skalenspreizung
Photometer Beckman DK-2A:	Beckman Instruments,Inc. Fullerton; California/USA
Waage: Mettler, Typ H 16:	Fa.Spoerhase AG., Gießen
Cuvetten: Normalcuvetten;	Schichtdicke d = 1
Halbmikrocuvetten;	Schichtdicke d = 2
Quarzcuvetten;	Schichtdicke d = 1
Zum Homogenisieren der Gewebsproben:	Glas-in-Glas-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM, Fa. Kobe, Marburg.
	"Rühromag"-Universalrührer Typ RU 10; Fa.F.Kurt Retsch,Haan/Rhld.
Wasseraufbereitungsanlage:	Fa.A.Lang, Zürich 47. Das dadurch hergestellte ionenfreie Wasser besaß einen Leitwiderstand von mehr als 2 Meg.Ohm.
Laborzentrifuge "Universal Junior III":	Fa.Martin Christ,Osterode/Harz
Kühlzentrifuge "Omicron":	Fa.Martin Christ,Osterode/Harz
Labor-pH-Meter Typ 13:	Fa.Knick, Berlin 37
Eppendorf-Pipetten Mikrosystem "Marburg":	Fa.Netheler & Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel

tert.-Butylhydroperoxid	80% in Di-tert.butylhydroperoxid techn.MG 90.12 FLUKA AG., Buchs SG
Essigsäure 100 % (Eisessig)	zur Analyse E.MERCK
Stärkelsg DAB 7 1%	
N_2 Zweiring-Flasche	
Kaliumjodid zur Analyse	MG 166,01 E. MERCK
o,1 n Na-thiosulfatlösung	Titrisol^R E. MERCK
Glutathion, reduziert, GSH Glutathion-Reduktase, GR Kristallsuspension 5 mg/ml Glyoxalase I ß-NADPH, Reinheitsgrad II	BOEHRINGER, Mannheim
Methylglyoxal 40-45% in H_2O	techn. FLUKA AG., Buchs SG
Ampuwa^R (aqua pro inject.)	Dr.E.FRESENIUS KG, Bad Homburg v.d.H.
Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	E.MERCK
di-Kaliumhydrogenphosphat $K_2H\ PO_4$	E.MERCK
di-Natriumhydrogenphosphat 2-hydrat Na_2HPO_4	E.MERCK
Nembutal^R: Pentobarbital Natrium 50 mg/ml	BOEHRINGER, Mannheim
Novesine^R: 0,4 %	Fa. WANDER, Osthofen

2. GEWINNUNG DES MATERIALS

2.1. Rinder- und Schweineaugen

Auf Grund der guten Zusammenarbeit mit der Gemeinschaftsschlachtanlage Marburg-Wehrda konnte die Augenenucleation jeweils spätestens 20 Minuten nach der Tötung der Tiere vorgenommen werden. Eine Auswahl der Tiere nach Geschlecht, Alter, Ernährung fand nicht statt.

Die Augen wurden direkt nach der Entnahme aus der Orbita mit physiologischer (0,9 %) Kochsalzlösung abgespült, um Verunreinigungen wie Blut und Haare zu entfernen.

Während des Transports in das Labor wurden die Augen in einem geschlossenen Gefäß gelagert und mit Kochsalzlösung feuchtgehalten. Es wurde darauf geachtet, daß die Konjunktiva zum Schutz über die Cornea gezogen war, und daß die Bulbi sich nicht berührten. Die Zeit vom Schlachten der Tiere bis zur Weiterverwendung des Materials betrug in keinem Fall mehr als 2 Stunden.

2.2. Hunde- und Katzenaugen

Die Hunde und Katzen waren Versuchstiere der Behring-Werke AG. Marburg bzw. des Physiologischen Instituts Marburg. Noch während des laufenden Versuchs wurden die Bulbi schonend entfernt, mit physiologischer NaCl-Lösung gesäubert und in derselben Weise wie die Rinder- und Schweineaugen in die Augenklinik transportiert. Hier betrug die Zeit bis zur weiteren Präparation nicht mehr als 1 Stunde.

2.3. Kaninchenaugen

Es wurden Tiere aus den Ställen der Augenklinik Marburg vom Stamm "Deutsche Widder" verwendet. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 3,5 - 4 kg.

Ihrem Gewicht entsprechend wurde den Tieren 3-4 ml Nembutal-Lösung in eine freipräparierte Ohrvene gespritzt und dabei auf eine langsame Verabfolgung der Narkoselösung ge-

achtet, um den sofortigen Exitus der Tiere zuvermeiden. Zusätzlich wurden 3 Tropfen einer 0,4% Novesin-Lösung als Lokalanästhetikum auf die Augen getropft.

Wie bei allen anderen Tieren wurden die Bulbi sodann vorsichtig herausgenommen und gesäubert. Die weitere Präparation fand sofort anschließend statt.

3. PRÄPARATION DER GEWEBE

Mit den enukleierten Augen der verschiedenen Tierarten wurde gleichermaßen verfahren. Es wurden nur Augen mit einwandfreier Hornhaut und ohne Bulbusverletzungen weiterverwendet.

3.1. Corneaepithel

Nachdem die Hornhaut nochmals mit NaCl gereinigt und mit Filterpapier abgetupft worden war, wurde das Epithel mit dem Hockeymesser unter leichtem Druck von der Peripherie zur Hornhautmitte abradiert. Am Limbus wurde ein 1 mm breiter Epithelstreifen stehengelassen: Dadurch konnte die Mitnahme von fremdem Gewebe vermieden werden.

Das gewonnene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Tiefkühltruhe (- 20° C) gelagert.

Das mittlere Gewebegewicht pro Cornea betrug beim Rind o,o6 g, beim Schwein o,o1 g, beim Hund o,o2 g, bei der Katze o,o1 g, beim Kaninchen o,o12 g.

3.2. Conjunctiva

Die Bindehaut wurde mit einer feinen Schere abpräpariert. Die Bindehautlappen sollten möglichst limbusnahe, d.h. nur dort, wo reichlich Epithel vorhanden und das Stroma noch locker ist, gewonnen werden. Sodann wurde das Gewebe auf Filterpapier abgetupft und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das mittlere Gewebegewicht betrug bei der Katze o,o13 g, beim Hund o,o15 g, beim Kaninchen o,o1 g.

3.3. Linse

Die Präparation der Linse erfolgte nach Hornhautschnitt in Limbusnähe, dann wurde die Hornhaut in cirkulärer Schnittführung abgetragen, die Linse unter mäßigem Druck auf den Bulbus aus ihrer Halterung gelöst. Sie glitt in toto heraus. Haftengebliebene Iris- und Glaskörperteile wurden vorsichtig entfernt. Es wurde darauf geachtet, daß die bikonvexe Linse mit ihrer hinteren, stärker gekrümmten Fläche auf ein Deckglas zu liegen kam.

Da in der Embryonalentwicklung die hinteren Zellen des Linsenbläschens zu Linsenfasern auswachsen, bleibt nur ein vorderes Linsenepithel erhalten, das sich mit seinen Ausläufern bis zum Äquator zieht. Daraus ergibt sich, daß nur die vorderen Abschnitte und Äquator als Versuchsgewebe geeignet sind.

Entsprechende Linsenteile wurden eingefroren. Das mittlere Gewebegewicht pro eingefrorenem Linsenteil lag beim Rind bei o,o9 g und beim Schwein bei o,o8 g.

3.4. Retina

Nachdem der Glaskörper herausgeflossen und der Bulbus umgestülpt worden waren, wurden zuletzt Retinaanteile mit einer feinen Pinzette abgezogen. Bei Rind und Katze wurde die Retina im Bereich der darunterliegenden, kristallhaltigen Zellschicht - dem Tapetum lucidum chorioidale - entnommen. Bei allen Arten wurde vermieden, Teile des Pigmentblattes und möglichst wenig Blutgefäße mit einzufrieren. Das mittlere Gewebegewicht der eingefrorenen Retina betrug beim Rind o,o3 g, beim Schwein o,o45 g.

Das gewonnene Material wurde ohne Ausnahme in gefrorenem Zustand nach Lagerung zum Extrakt weiterverarbeitet.

4. Homogenisierung der Gewebe

Zur Aufbereitung der Extrakte wurde ein 100 mM Kalium-Natrium-Phosphatpuffer mit einem pH von 7.2 als Extraktionsmedium verwandt. Die Menge des eingewogenen Puffers richtete sich nach dem vorhandenen Gewebegewicht. Die Verdünnung durfte nicht zu groß sein, damit die Enzymkonzentration im Extrakt nicht zu gering wurde.

Als Hilfe für eine Aussage über die Extraktverdünnung wurde der Faktor des Feuchtgewichtes des Gewebes herangezogen.

$$\text{FAKTOR} = \frac{\text{ml des Puffers + Gewebegewicht}}{\text{Gewebegewicht}}$$

Je größer der Faktor, desto geringer war die Konzentration der Enzyme im Extrakt. Im allgemeinen lag der Faktor um 40, bei RCE bei 70, bei Retinaextrakten bei 30.

Da die Gewebemengen immer sehr gering waren, wurden Puffer und Material sofort in einem Glas-in-Glas-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM eingewogen und bei 1500 U/min 5 Minuten homogenisiert (Bindehaut 20 Minuten). Die auftretende Reibungswärme wurde durch Eiswasserkühlung beseitigt. Der milchig-weiße Niederschlag wurde sodann in einer Kühlzentrifuge (- 4° C) bei 15000 U/min in 10 Minuten abgeschieden, der zentrifugierte, klare Überstand dekantiert und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

5. Bestimmungsmethoden

5.1. Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Peroxidase

Wie in I.4. bereits dargelegt, wurden die verschiedensten Testsysteme zur GSH-POD Bestimmung ausgearbeitet.

Eine der weniger aufwendigen Methoden beschrieben PAGLIA und VALENTINE (97), bei denen der gekoppelt-enzymatische Test zur Anwendung kam. Diese Bestimmungsmethode hat den Vorteil, daß sie mit geringem apparativen Aufwand durchzuführen ist und sich nach FLOHÉ (29,30) besonders für Aktivitätsmessungen aus ungereinigtem Material eignet.

Dieses Verfahren wurde auch von FLOHÉ als eine der elegantesten Methoden zur GSH-POD Bestimmung bezeichnet, die besonders als Screeningtest in Frage kommt. Vor kurzer Zeit wurde der gekoppelt-enzymatische Test für klinische Routineuntersuchungen in der Hämatologie von BOGUSLAWSKA-JAWROSKA und KAPLAN (11) ausgearbeitet.

Die von PAGLIA und VALENTINE (97) angegebene Methode ist ähnlich der von MILLS (88), der die Menge an oxidiertem GSH bestimmte, die durch die Reaktion von GSH mit H_2O_2 mit dem Enzym GSH-POD entsteht. Statt, wie MILLS (88) den dauernden Verlust von GSH zu messen, hielten PAGLIA und VALENTINE (97) aber dieses Substrat in konstanter Konzentration und fügten H_2O_2, GR und NADPH hinzu. Die GR wandelt alles entstandene GSSG mit dem Coenzym NADPH in reduziertes GSH um. Die Menge des entstandenen GSSG wird dann bestimmt durch die Abnahme von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 bzw. 366 nm; d.h. man nimmt eine Indikatorreaktion - in diesem Fall den photometrischen meßbaren Verlust von NADPH - zuhilfe. Die Abbildung 2 zeigt das Reaktionsschema des gekoppelt-enzymatischen Testes.

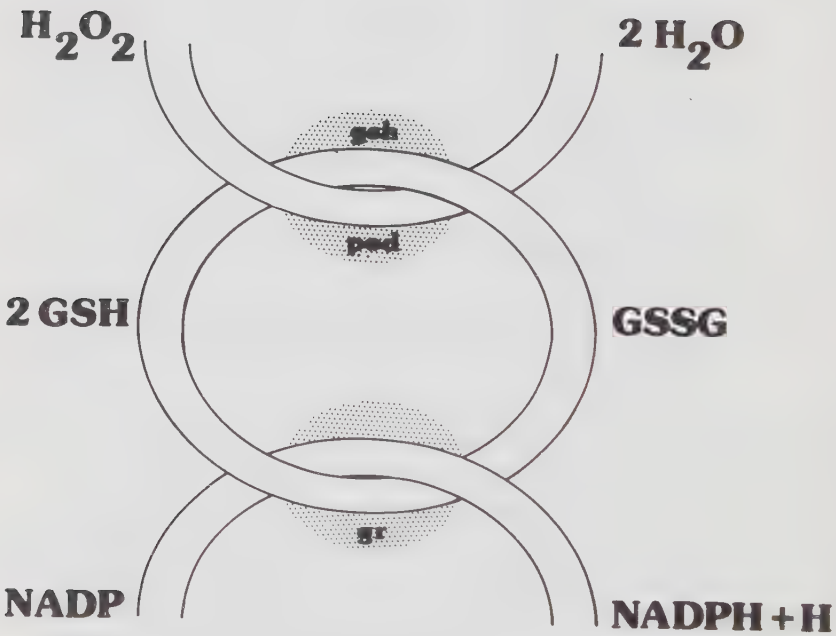


Abb. 2: **Reaktionsschema des gekoppelt-enzymatischen Testes.**

In dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Methode von PAGLIA und VALENTINE (97) angewandt, nur daß an die Stelle von H_2O_2 das Peroxid t-Bhp getreten ist. Es wurde zunächst versucht, die Methode für die Gewebe des Auges zu standardisieren, um dann Reihenaktivitätsmessungen mit dieser ermittelten Standardtestzusammensetzung auszuführen.

Gemessen wurde am Beckman-Photometer und am Photometer Eppendorf - beide mit Registriereinrichtung - bei einer Wellenlänge von 366 nm. Puffer, NADPH, GR und reduziertes GSH wurden zusammen mit einer definierten Menge Extrakt in eine Cuvette mit der Schichtdicke d = 1 pipettiert und mit aqua dest. auf ein Testvolumen von 1 ml aufgefüllt. Während der Messung wurden die Cuvetten ständig auf einer Temperatur von 25° C gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Testansatz mit einer konstanten Menge t-Bhp gestartet und die Extinktionsabnahme gemessen.

Der Leerwert wurde täglich neu bestimmt und vor der Auswertung jeweils von der gemessenen Extinktionsdifferenz abgezogen. Die Enzymaktivität der einzelnen Extrakte wurde mit verschieden großen Einsätzen und immer doppelt bestimmt.

5.2. Kinetische Untersuchungen der Glutathion Peroxidase

Zur Ermittlung der Standardtestzusammensetzung wurde außerdem versucht, für das Substrat t-Bhp die Michaelis-Menten-Konstante zu bestimmen. Diese K_m-Bestimmung erfolgte nur mit dem Extrakt der Cornea der verschiedenen Tierarten.

Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß die Glutathion-Konzentration konstant gehalten und die t-Bhp-Konzentration variiert wurde.

Die Michaelis-Menten-Konstante wurde dann mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms ermittelt. Die reziproken Werte der verschiedenen Substratkonzentrationen in mM wurden auf der Abzisse, die reziproken Werte der Enzymaktivität IE/g frisch auf der Ordinate aufgetragen. Die Verbindung der aufgetragenen Punkte ergab eine Gerade, aus deren Schnittpunkt mit der Abzisse der reziproke Wert von K_m abzulesen war.

5.3. Konzentrationsbestimmung des tert.-Butylhydroperoxids

Das in dieser Arbeit verwendete tert.-Butylhydroperoxid (t-Bhp) war ein technisches Präparat der Firma Fluka AG., Buchs SG.

Es hatte einen Gehalt von 80 % in Di-tert-Butylhydroperoxid und ein Molekulargewicht von 90.12.

Die Konzentration von t-Bhp wurde nach KOLTHOFF und MEDALIA (76) bestimmt:

o,1 ml des 80 % t-Bhp werden in 100 ml Eisessig (!) gelöst. Von diesen 100 ml werden 25 ml in einer Braunglasflasche 5 Minuten mit N_2 durchströmt, um den vorhandenen O_2 auszutreiben.

Danach wird der Ansatz mit 2 g zerriebener KJ versetzt, wobei es genügt, KJ im Überschuß hinzuzugeben, da nicht alles in Lösung zu gehen braucht.

Die Lösung wird dann noch mindestens 20 Minuten bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehengelassen. Das entstandene J_2 wird mit 0,1 n Na-thiosulfatlösung ($Na_2 S_2 O_3$) titriert, als Indikator wird Stärke (Amylose zum Jodnachweis) verwendet.

Legt man 5 ml der verdünnten, mit N_2 durchströmten und KJ versetzten t-Bhp Lösung vor, so pflegt der Verbrauch bei Titration bei 1 ml zu liegen.

Das entspricht nach Berechnung (75) einer Molarität von 10 für die hier verwendete t-Bhp Charge.

Die Bestimmung wurde mehrere Male in zeitlichen Abständen während der laufenden Versuche wiederholt - die Molarität blieb konstant. Verdünnte t-Bhp Lösungen wurden nicht länger als 5 Tage benutzt.

Der H_2O_2-Gehalt von unverdünnten t-Bhp Präparaten kann vernachlässigt werden (GÜNZLER,W. persönliche Mitteilung) Er läßt sich mit Titansulfat in 1 m H_2SO_4 bei 405 nm photometrisch bestimmen.

5.4. Konzentrationsbestimmung des reduzierten Glutathions

Die Molarität der jeweils angesetzten Glutathion-Lösung wurde enzymatisch mit der Glyoxalasemethode bestimmt. GSH ist ein spezifischer Aktivator des Enzyms Glyoxalase, der Methylglyoxal in Milchsäure umwandelt.

Da GSH der limitierende Faktor der Reaktion ist, wird die Umsatzrate von ihm bestimmt; d.h. die Konzentration der S-Lactylverbindung steigt entsprechend der eingesetzten GSH-Menge proportional an.

Das entstehende Substrat wird bei 240 nm photometrisch bestimmt und der GSH-Gehalt durch die Extinktionsänderung rechnerisch ermittelt:

$$C = \frac{E \times V}{\varepsilon \times d \times v} \quad \text{(mM/l Probe)}$$

$\varepsilon = 3.37 \cdot 10^6$

V = Küvetteninhalt in ml

d = Schichtdicke der Küvette

v = eingesetzte GSH-Menge in ml

E = Extinktionsdifferenz

Testvorschrift:

Standardtestzusammensetzung		Konzentration i.T. 1 ml Testansatz
K-Na-P-Puffer		
0.5 ml	100 mM	0.05 M
Methylglyoxal		
0.05 ml	1 %	0.05 %
GSH		
0.1 ml	1 : 100	
Glyoxalase I		
0.02 ml	1 : 10	

5.5. Quantitative Proteinbestimmung in den verschiedenen Geweben des Auges

Nach der Enzymaktivitätsmessung wurden die aufbereiteten Extrakte tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt der Proteingehalt bestimmt.

Es wurde die Biuretmethode nach BEISENHERZ, BOLTZE, BÜCHER et al. (5) angewandt, modifiziert entsprechend den hier vorliegenden Mikroverhältnissen. Folgendes Prinzip liegt ihr zugrunde: Kupfersalze bilden in alkalischem Milieu mit den in allen Eiweißkörpern vorhandenen Carbamylgruppen eine blaue bis purpurrote Farbe, deren Intensität photometrisch bestimmt wird.

Die Berechnung des Eiweißgehaltes erfolgte aus einer Eichkurve, die durch Verdünnung von Rinderserum mit bekanntem Eiweißgehalt gewonnen wurde. Als Bezugsgröße ergab sich eine Extinktion von 0,24 für 1 mg Rinderserumalbumin bei einem Gesamtansatz von 2 ml. Für einen Gesamtansatz von 1 ml ist die Extinktionsdifferenz entsprechend 0.48.

Biuretreagenz und physiologische NaCl, mit Extrakt aufgefüllt, wurden im Verhältnis 1:1 angesetzt. Je nach noch vorhandener Extraktmenge war der Gesamtansatz 1 oder 2 ml.

Die angesetzten Lösungen wurden nach guter Durchmischung zur Ausbildung der Farbe 30 Minuten stehengelassen. Die Extinktion wurde bei 546 nm im Eppendorf-Photometer mit Küvetten der Schichtdicke d = 1 oder mit Halbmikroküvetten bestimmt.

Durch Vergleich mit Rinderserum ergibt sich der Eiweißgehalt in mg/g Feuchtgewicht entsprechend der Formel:

$$mg/g\ \text{frisch} = \frac{1\ \text{mg Serumalbumin} \times E_{\text{Extrakt}} \times F_{\text{Extrakt}}}{E_{\text{Serumalbumin}} \times \text{Extrakteinsatz in ml}}$$

E = Extinktionsdifferenz

$$F = \frac{\text{ml Puffer + Gewebsgewicht}}{\text{Gewebsgewicht}}$$

6. Berechnung der Einzelwerte

Die Enzymaktivität in IE wurde auf das Feuchtgewicht des Gewebes bezogen und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{IE/g frisch} = \frac{E \times 10^6 \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{\text{Minuten} \times \varepsilon \times d \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebegewicht}}$$

IE = Internationale Einheiten

E = Extinktionsdifferenz

ε = Extinktionskoeffizient bei 366 nm = 3.3×10^6

d = Schichtdicke der Küvette

7. Die statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Enzymbestimmungen wurden größtenteils als Doppel- und Dreifachbestimmungen mit verschieden hohen Einsätzen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde als Einzelwert betrachtet und statistisch ausgewertet. Die Berechnung des Mittelwertes der Standardabweichung und der Abweichung des Mittelwertes erfolgte nach den hier wiedergegebenen Formeln:

1. Summe der Einzelwerte x = $s_{(x)}$
2. Summe der Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert $S_{(x-M)}$
3. Summe der Abweichung im Quadrat $S_{(x-M^2)}$

Wenn die Zahl der Einzelwerte x ist, dann ist der Mittelwert $M = s_{(x)} : n$

Die Streuung ist $s^2 = \frac{s_{(x)}^2 - M \cdot s_{(x)}}{n - 1}$

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Quadratwurzel der Streuung s^2

$$s = \frac{S_{(x)}^2}{n - 1} - \frac{M \cdot S_{(x)}}{}$$

Die Streuung des Mittelwertes der Stichproben wird bestimmt nach:

$$s_M^2 = \frac{1}{n} \; s^2$$

und die Standardabweichung der Mittelwerte nach:

$$s_M = \frac{1}{n} \; . \; s$$

IV. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

1. Ergebnisse zur Standardisierung des gekoppelt enzymatischen Testes

Für ihren Test mit Hämolysat gaben PAGLIA und VALENTINE (97) 1967 als ideale Substratkonzentration eine 0.00 5 M GSH und 7.33×10^{-5} M H_2O_2 an. Auf diese Weise hielten sie auch den Wert der nicht enzymatischen Reaktion der beiden Substrate untereinander klein.

REIM und HEUVELS (105), die mit der gleichen Methode arbeiteten, richteten sich in ihrer Testzusammensetzung zunächst nach den von FLOHÉ (34) gegebenen Anweisungen für die Substratkonzentration, setzten aber das Gesamtvolumen auf 1 ml herab. Nach ihren Angaben führte jedoch dieser Ansatz zu keinen optimalen Werten. REIM und HEUVELS (105) ermittelten eine optimale GSH-Konzentration von 4 mM und eine H_2O_2-Konzentration von 0.04 mM für die Gewebe des Auges. Die von FLOHÉ (34) angegebene Substrathemmung trat bei diesen Autoren erst bei GSH-Konzentrationen, die höher als 4 mM waren, auf. Damit lagen sie mit der GSH-Konzentration bei einem Wert, der auch in vivo vorkommt. Der GSH-Gehalt der Rindercornea wurde von LUTHE (85) mit 3.6×10^{-6} Mol/g frisch angegeben.

Bei den Aktivitätsmessungen dieser Arbeit wurde zunächst entsprechend den von REIM und HEUVELS (105) angegebenen Werten verfahren. Sie führten jedoch zu keinen befriedigenden Ergebnissen, da sich die GSH-Konzentration mit 4 mM als zu hoch erwies.

Es wurden dann Reihenuntersuchungen am Rindercorneaepithel durchgeführt, bei denen die GSH- und t-Bhp-Konzentration variiert wurden. Nach diesen Tests ergab sich, daß bessere Ergebnisse mit äquimolaren Konzentrationseinsätzen von GSH- und t-Bhp erzielt

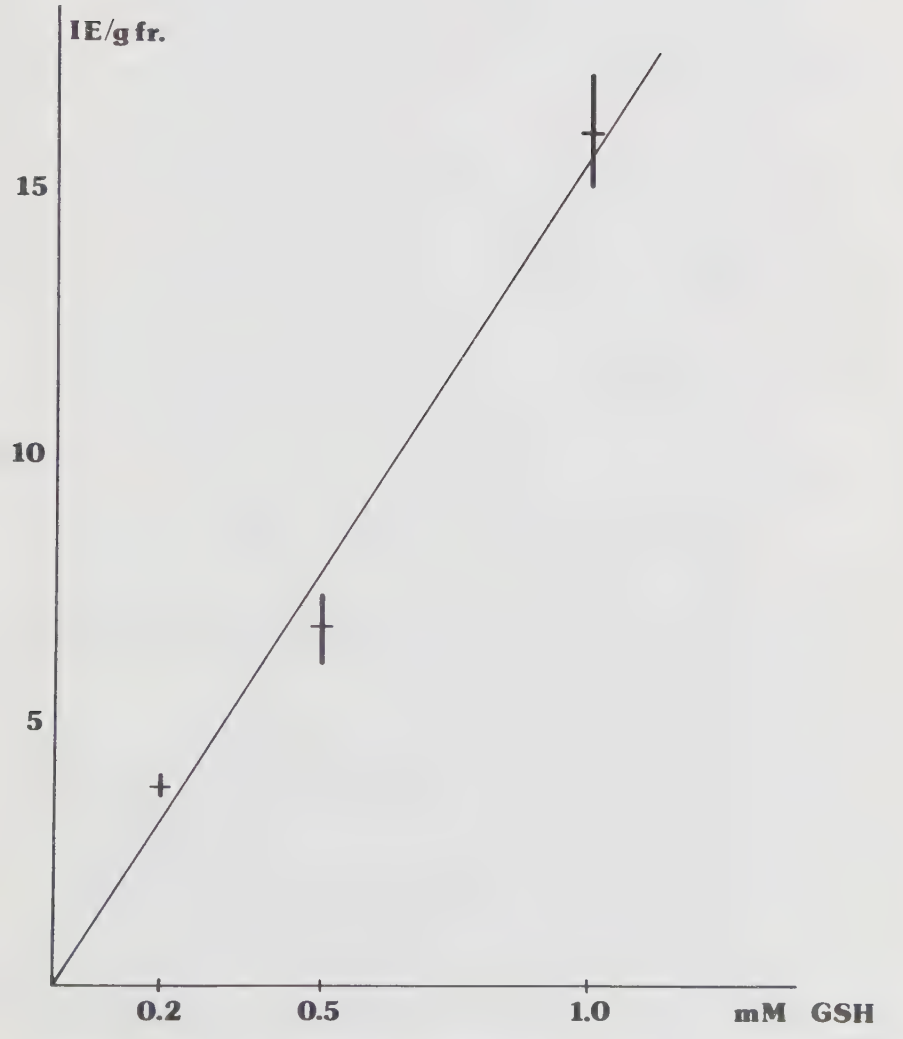


Abb.3: Äquimolare Konzentrationseinsätze von t-Bhp und GSH – GSH-POD Aktivität in IE/g frisch. RCE

wurden. Diese so durchgeführten Messungen zeigten gute Proportionalität: Mit steigenden Substrat - konzentrationen wurden steigende Enzymaktivitäten registriert, wie aus dem Kurvenbild der Abbildung 3 hervorgeht. Lediglich eine GSH-Konzentration von 1-4 mM mit einer t-Bhp-Konzentration von 0.5 mM zeigte vergleichbar gute Resultate im Hinblick auf die Proportionalität (Abbildung 4). Die gleichen GSH-Konzentrationen bei nur 0.2 mM t-Bhp reichten für den Test nicht mehr aus - die Enzymaktivitäten konnten nicht mehr zunehmen, da die t-Bhp-Konzentration zu gering war (Abbildung 5).

Wie von FLOHÉ (34) angegeben, wurde daraufhin die Donorsubstratkonzentration auf maximal 1 mM im Inkubationsansatz gesenkt. Die bei den Messungen aufgetretene Produkthemmung der GR durch GSH wurde danach nicht mehr beobachtet.

Eine Besonderheit des Reaktionsverhaltens dieses Enzyms ist, wie in I. 5.2. dargelegt, daß die K_m-Werte für Hydroperoxide proportional der GSH-Konzentration ansteigen. FLOHÉ (43) hat dazu durch den sogenannten Ping-Pong-Mechanismus eine Erklärung gegeben.

Um das Enzym bei jeder Donorsubstratkonzentration in gleichem Maße mit Akzeptor gesättigt zu halten, muß das Verhältnis zwischen GSH und Hydroperoxid konstant bleiben. Wenn beide Substrate äquimolar - 1 mM - eingesetzt werden, und man zugrunde legt, daß GÜNZLER et al. (GÜNZLER,W. persönliche Mitteilung 1973; 46) einen K_m (t-Bhp)-Wert von 0.03 mM bei einer 1 mM GSH gefunden haben (Rindererythrozyten), so liegt t-Bhp dann bei 30-facher K_m-Konzentration.

Bei äquimolaren Einsätzen sind die Konzentrationen genügend hoch, so daß das t-Bhp während der Messung nicht unter den Sättigungsbereich abfallen kann.

Legt man den K_m (t-Bhp)-Wert von GÜNZLER et al.(46) zugrunde, so ergibt sich, daß man bei Einsätzen von 1 mM GSH und 0.5 mM t-Bhp noch bei 16-facher K_m-Konzentration mißt, bei 3 mM GSH und 0.5 mM t-Bhp noch bei 5.5-facher und bei 4 mM GSH und 0.5 mM t-Bhp nur noch bei 4-facher K_m-Konzentration. Aus dem zuletzt Gesagten wird verständlich, daß bei noch niedrigerem Einsatz von t-Bhp (0.2 mM) bei der Aktivitätsmessung keine Proportionalität mehr erreicht werden kann, was auch durch das Kurvenbild zum Ausdruck kommt (Abbildung 5).

Vergleichsweise messen REIM und HEUVELS (105) bei ihren angegebenen Konzentrationen (4 mM GSH und 0.04 mM H_2O_2) und dem ermittelten K_m-Wert von 0.01 mM nur bei 4-facher K_m-Konzentration.

Außerdem muß die Spontanoxidation von GSH durch t-Bhp berücksichtigt werden, die als unkatalysierte Reaktion vermutlich allein von den Konzentrationen der Substrate abhängt. Hohe Substratkonzentrationen bewirken deshalb hohe Spontanwerte, verbrauchen das zur Sättigung benötigte t-Bhp und erfordern höhere GR-Einsätze, um die rasche GSH Oxidation zu kompensieren.

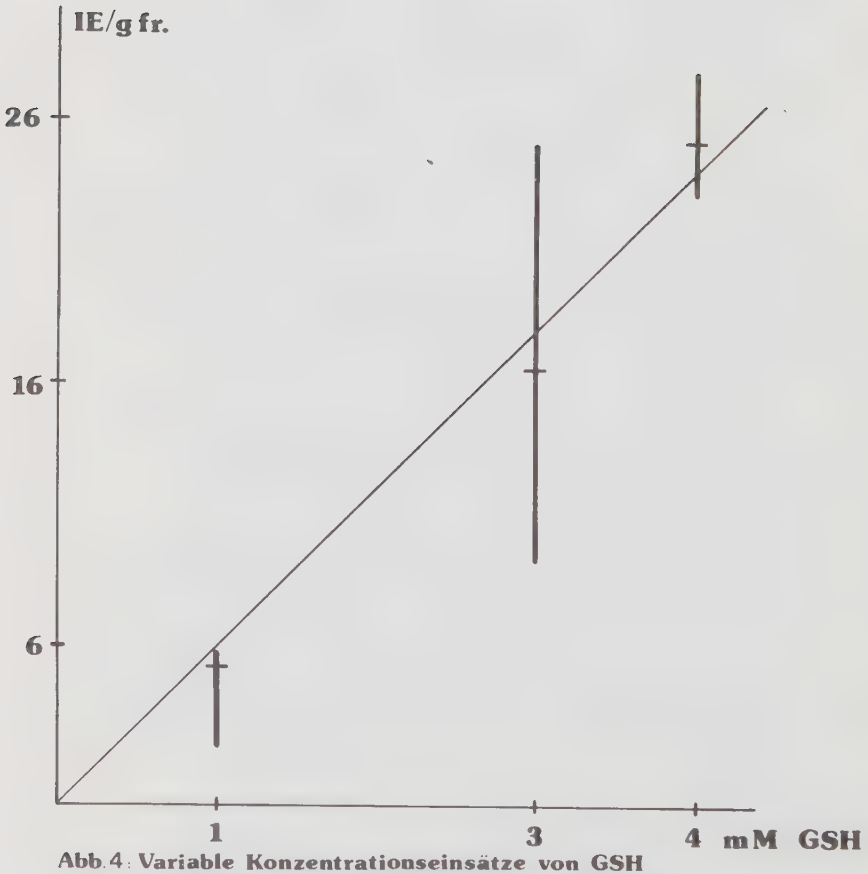


Abb. 4: Variable Konzentrationseinsätze von GSH und konstante t-Bhp Konzentration – 0,5 mM – GSH-POD Aktivität in IE/g frisch-RCE.

Abb.5 Variable Konzentrationseinsätze von GSH und konstante t-Bhp Konzentration – 0.2 mM –
GSH POD Aktivität in IE/g frisch – RCE –

Entsprechend diesen Ausführungen wurde folgende Testzusammensetzung für die Gewebe des Auges festgesetzt:

1 ml Inkubationsansatz
Wellenlänge 366 nm
pH = 7.0

Standardtest-zusammensetzung		Konzentration im Test
0.1 M K-P-Puffer pH = 7.2.	0.5 ml	0.05 M
1 mM EDTA		0.5 mM
NADPH 8 mg/ml	0.06 ml	0.48 mg/ml
GR 5 mg/ml verdünnt 1:25	0.02 ml	0.004 mg/ml
GSH 10 mM	0.1 ml	1 mM
t-Bhp 50 mM	0.02 ml	1 mM
variabler Extrakteinsatz		
aqua dest. ad	1 ml	

2. Ergebnisse zur kinetischen Untersuchung der Glutathion-Peroxidase

Im Interesse eines besseren Verständnisses der biologischen Funktion des Enzyms wurde seine Kinetik von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht (33,45,97,105,116) .

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat t-Bhp bestimmt. Die Konzentration des GSH lag bei 1 mM.

Als Gewebeextrakt wurden nur die Corneaepithelien der verschiedenen Tierarten verwandt und für das Rindercorneaepithel wurde zusätzliche ein K_m (t-Bhp)-Wert bei einer 3 mM GSH-Konzentration bestimmt.

In den folgenden Diagrammen sind einige Ergebnisse graphisch dargestellt (Abbildung 6-11).

Vergleicht man die Werte für K_m (t-Bhp) für 1 mM und 3 mM GSH, so zeigt sich der proportionale Anstieg der K_m-Werte für das Hydroperoxid bei steigender GSH-Konzentraion. Auch dies ist in einem Kurvenbild (Abbildung 8) dargestellt.

Die übrigen in der Literatur angegebenen K_m-Werte gelten alle für das Hydroperoxid H_2O_2, nur GÜNZLER et al. (46) gaben einen K_m (t-Bhp)-Wert aus Rindererythrozyten an; die GSH-Konzentraion lag ebenfalls um 1 mM und der K_m-Wert bei 0.03 mM.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen für das Auge sind in einer Tabelle zusammengestellt.

Extrakt	K_m(t-Bhp)	GSH-Konzentration
RCE 25	$5 \cdot 10^{-5}$M	$1 \cdot 10^{-3}$M
RCE 56	$5{,}5 \cdot 10^{-5}$M	
RCE 59	$4{,}1 \cdot 10^{-5}$M	
RCE 60	$3 \cdot 10^{-5}$M	
RCE 25	$10 \cdot 10^{-5}$M	$3 \cdot 10^{-3}$M
RCE 26	$8 \cdot 10^{-5}$M	
SCE 9	$7 \cdot 10^{-5}$M	$1 \cdot 10^{-3}$M
SCE 10	$4 \cdot 10^{-5}$M	
SCE 23	$3 \cdot 10^{-5}$M	
Kan-CE 3	$3 \cdot 10^{-5}$M	$1 \cdot 10^{-3}$M
Kan-CE 5	$3 \cdot 10^{-5}$M	
Hu-CE 11	$5 \cdot 10^{-5}$M	$1 \cdot 10^{-3}$M

Tabelle 1: Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat t-Bhp im CORNEAEPITHEL.

Rindercorneaepithel

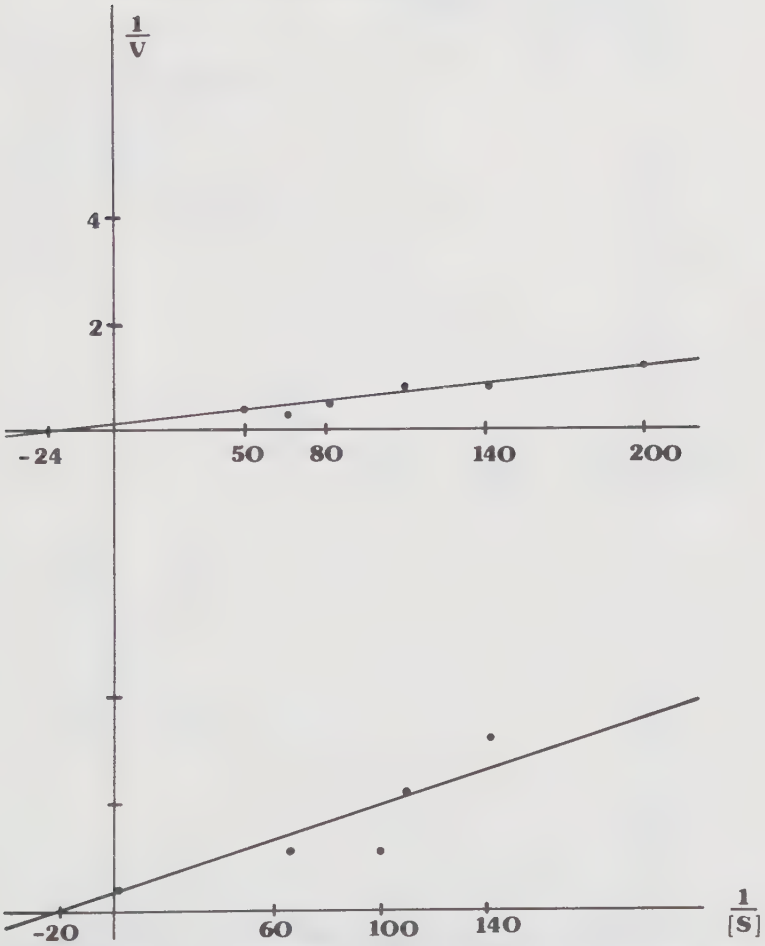


Abb. 6: Lineweaver-Burk- Diagramm der GSH-POD für das Substrat t-Bhp. 1mM GSH- RCE 59u.25-

Ordinate: $\frac{1}{V} = \frac{1}{IE/g\ frisch}$

Abzisse: $\frac{1}{[S]} = \frac{1}{[mM]}$

Rindercorneaepithel

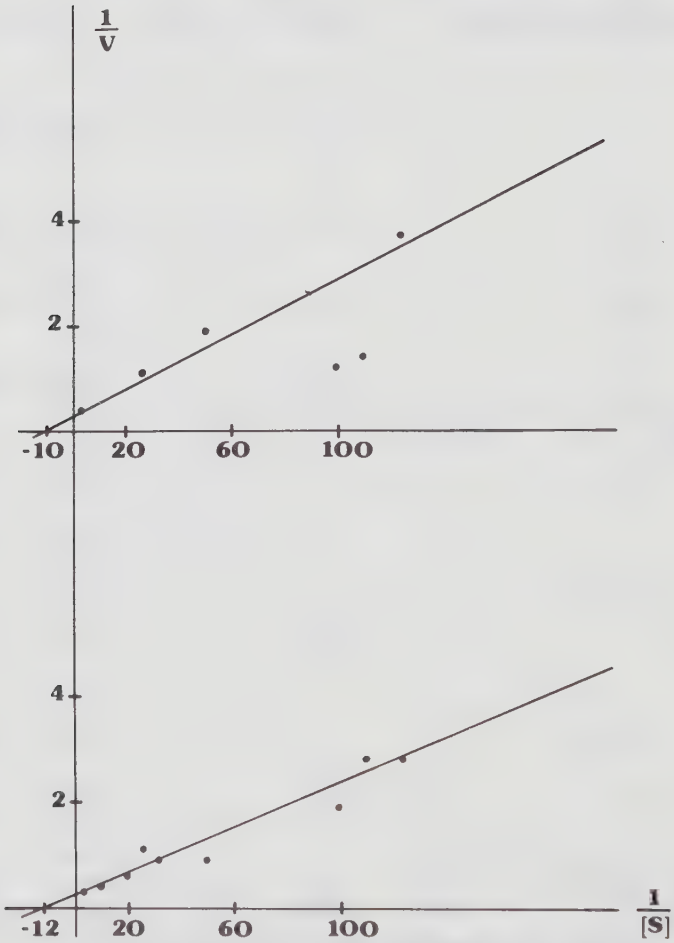


Abb.7: Lineweaver-Burk-Diagramm der GSH-POD für das Substrat t-Bhp. 3mM GSH- RCE 26 u. 25-

Ordinate: $\frac{1}{V} = \frac{1}{IE/g\ frisch}$

Abzisse: $\frac{1}{[S]} = \frac{1}{[mM]}$

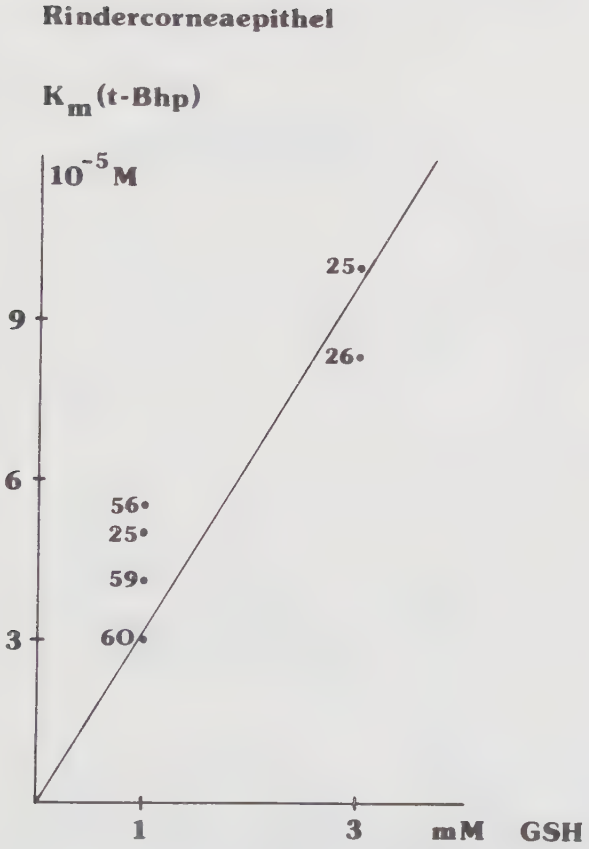


Abb.8: Graphik zur Verdeutlichung des linearen Anstiegs des K_m(t-Bhp)-Wertes bei steigenden GSH-Konzentrationen.

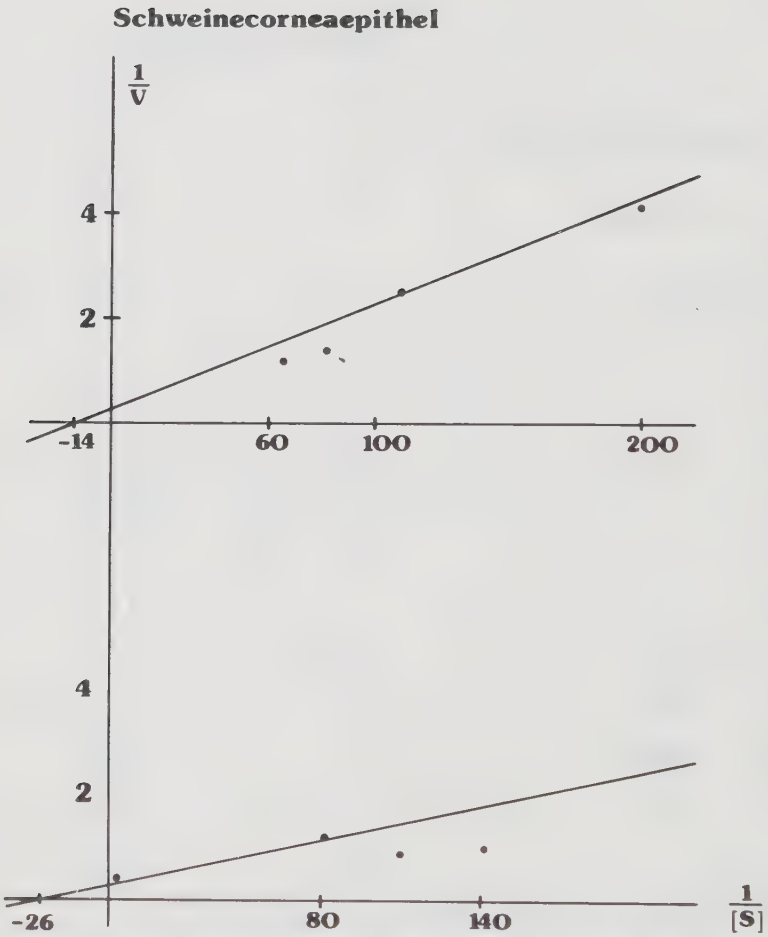


Abb. 9: Lineweaver-Burk-Diagramm der GSH-POD für das Substrat t-Bhp. 1mM GSH- SCE 9 u. 10-
Legende s. Abb. 6

Hundecorneaepithel

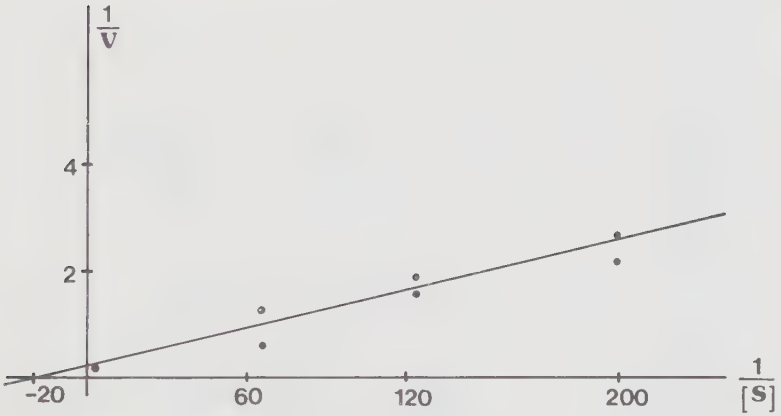


Abb.10: Legende s. Abb. 6-Hu-CE 11-

Kaninchencorneaepithel

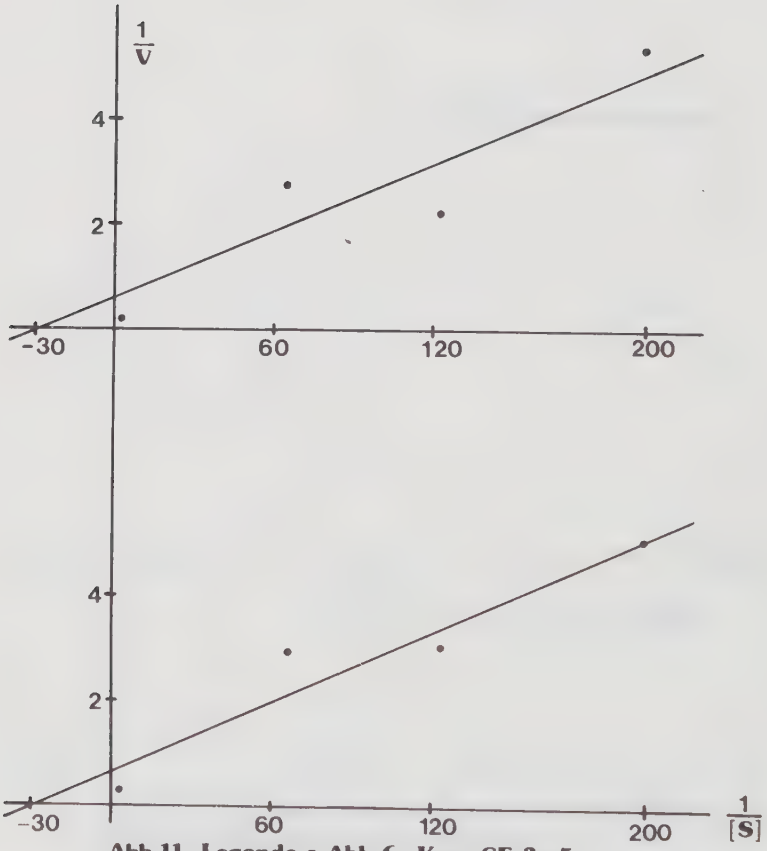


Abb.11: Legende s. Abb. 6 – Kan–CE 3u.5.

3. Ergebnisse zur Reihenaktivitätsmessung der Glutathion Peroxidase in den verschiedenen Geweben des Auges und Vergleich mit der Literatur

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung mit dem standardisierten, gekoppelt-enzymatischen Test sind in Tabellen und Graphiken zusammengestellt.

3.1. RIND

3.1.1. Rindercorneaepithel (Abbildung 12)

Wie der Graphik zu entnehmen ist, liegen die Werte für das Corneaepithel, wie auch bei HEUVELS (59), am höchsten. Ein echter Vergleich dieser beiden Werte ist jedoch nicht möglich, da HEUVELS mit einer höheren Donorsubstratkonzentration - 4mM GSH - und mit H_2O_2 als Peroxid gearbeitet hat.

Die Werte von ANDERSON und SPECTOR (3), die ebenfalls mit dem gekoppelt-enzymatischen Test ermittelt worden sind, können nicht verglichen werden, da sie in anderen Aktivitätseinheiten angegeben wurden. Die GSH-Konzentration lag zwar mit 1,2 mM in dem hier gemessenen Bereich, die H_2O_2-Konzentration allerdings weitaus niedriger (1.8×10^{-4} M). HEUVELS (59) hat für die Angaben von ANDERSON und SPECTOR (3) eine Umrechung auf IE/g frisch versucht. Danach lagen die Werte weit unter denen von HEUVELS und mit vergleichbarer GSH-Konzentration auch unter denen dieser Arbeit.

3.1.2. Linse

Über die GSH-POD Aktivitätsaussagen der Linse liegen bereits seit 1965 Werte von PIRIE (99) vor. Leider ist auch hier kein direkter Wertevergleich mit dieser Arbeit möglich.

PIRIE (99) hat zwar ungefähr in den gleichen Konzentrationen gemessen (2 mM GSH und 1 mM H_2O_2), jedoch eine völlig andere Methode angewandt, die die GSH-POD Aktivität an Hand des GSH-Verlustes maß. Auch

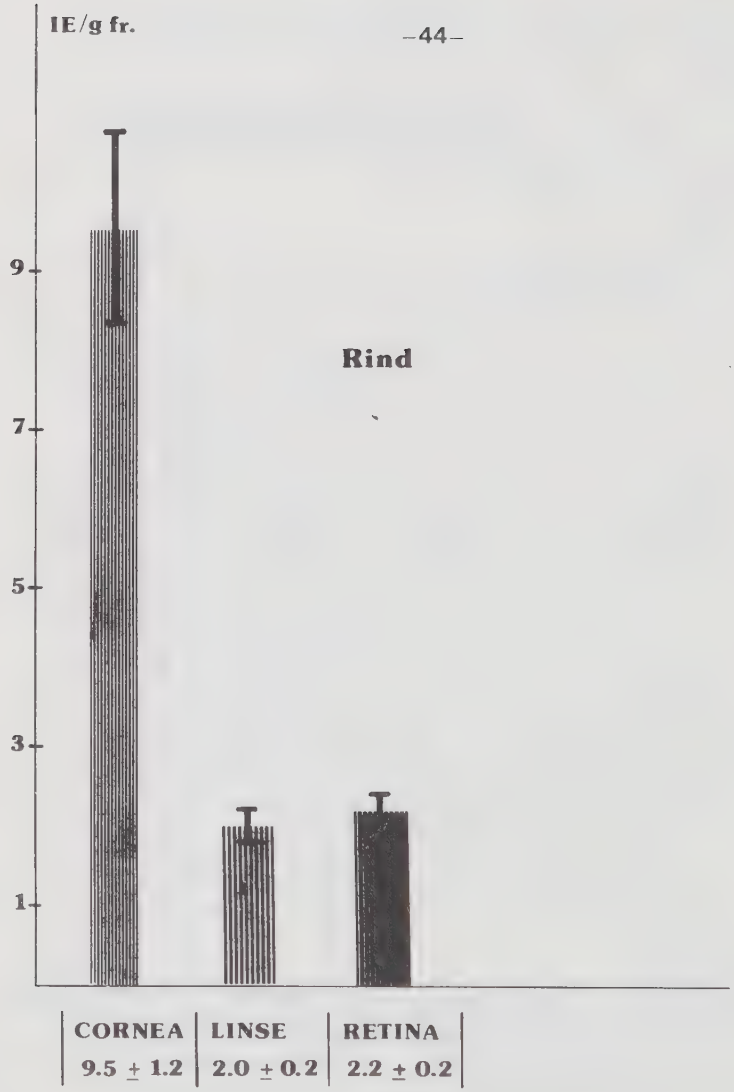


Abb.12: GSH-POD Werte (IE/g frisch) und s_m für die Augengewebe beim Rind.

hier hat HEUVELS (59) eine Umrechnung versucht; danach beträgt der von PIRIE (99) ermittelte Wert 0.68 IE/g frisch.

Damit ist in dieser Arbeit der Wert bei vergleichbaren Konzentrationen, aber verschiedenem Peroxid etwa dreimal so hoch, der von HEUVELS (59) liegt ebenfalls niedriger. Das mag zum Teil an den unterschiedlichen Präparationsmethoden der Experimentatoren liegen. Nach REIM und HEUVELS (105) soll sich das Enzym nur im Epithel der Linse befinden, so daß diese Linse entsprechend präpariert werden mußte.

HOLMBERG (64) hingegen reicherte das Enzym aus der Linse an und wies darauf hin, daß das Epithel, die die Rinde und der Kern von Rinderlinsen keine wesentlichen Unterschiede in der spezifischen Aktivität des Enzyms zeigen.

3.2. SCHWEIN (Abbildung 13)

3.2.1. Schweinecorneaepithel

Mit 5.0 IE/g frisch liegt dieser Wert etwa um die Hälfte niedriger als der im Rindercorneaepithel. Es gibt keine Vergleichswerte aus der Literatur.

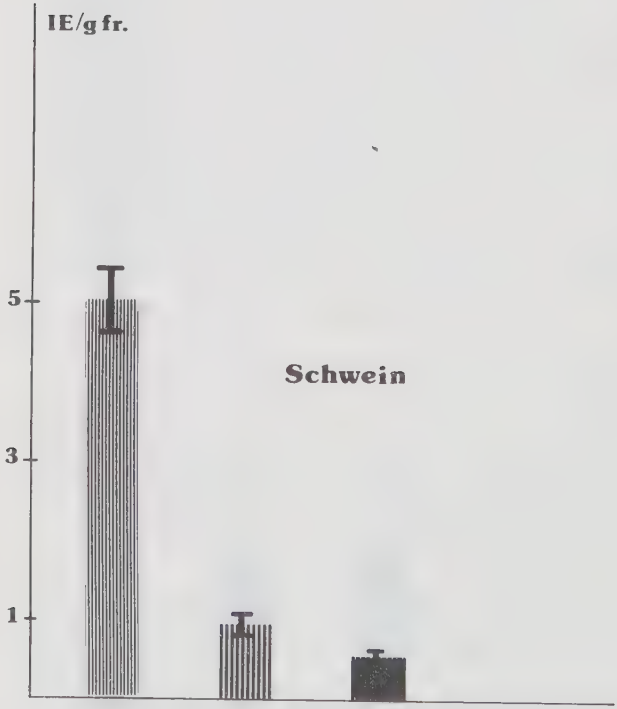
3.2.2. Linse und Retina

Auch diese Werte liegen auffällig niedriger als die des Epithels. Die Anzahl der Messungen war jedoch sehr gering (n= 4 bzw. n= 3), so daß sie nur als richtungsweisend angesehen werden können. Auch hier gibt es keine Literaturvergleichswerte.

3.3. HUND und KATZE

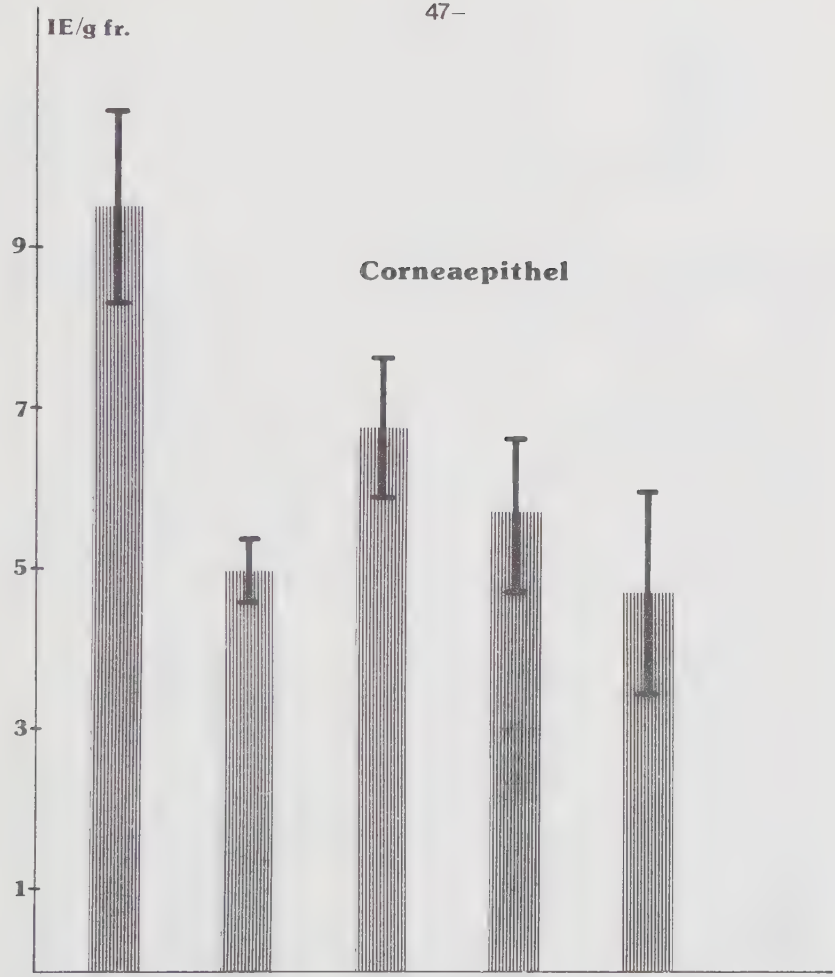
Für diese beiden Tierarten gibt es keinerlei Vergleichswerte aus der Literatur.

Die Werte für die Bindehaut sollten nur als ungefähre Anhaltspunkte angesehen werden.



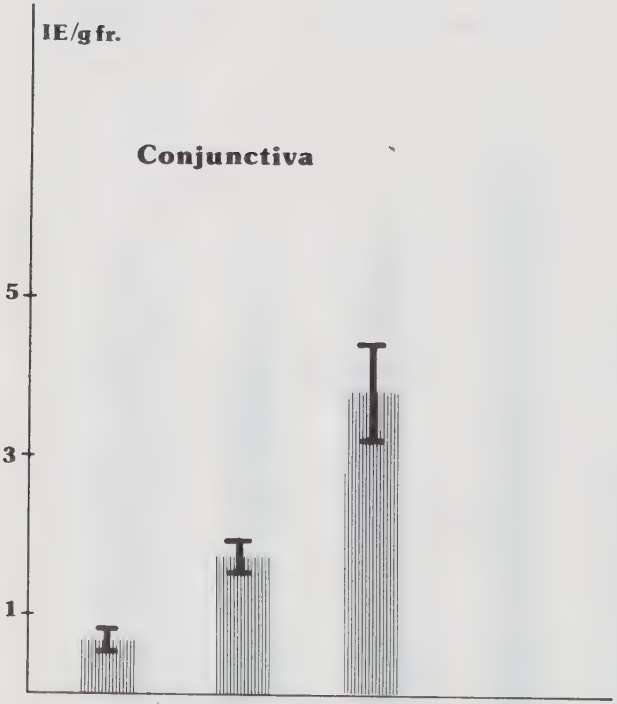
CORNEA	LINSE	RETINA
5.0 ± 0.4	0.9 ± 0.18	0.5 ± 0.04

Abb.13: GSH-POD Werte (IE/g frisch) und s_m für die Augengewebe beim Schwein.



RCE	SCE	Hu-CE	Ka-CE	Kan-CE
9.5 ± 1.2	5.0 ± 0.4	6.8 ± 0.9	5.7 ± 1.0	4.7 ± 1.3

Abb.14: GSH-POD Werte (IE/frisch) und s_m in den Corneaepithelien.



HUND	KATZE	KANINCHEN
0.65 ± 0.13	1.7 ± 0.2	3.8 ± 0.6

Abb.15: GSH POD Werte (IE/g frisch) und s_m für die Conjunctiva.

	CORNEAEPITHEL		LINSE		RETINA		CONJUNCTIVA	
	Eig. Werte	Literatur	Eig. Werte	Literatur	Eig. Werte	Literatur	Eig. Werte	Literatur
Rind	9.5 ±1.2 n=7	16.0 ±1.4 HEUVELS 0.6 ANDERSON 1.4 u SPECTOR	2.0 ±0.2 n=7	1.7 ± 0.2 HEUVELS 0.7 PIRIE	2.2 ±0.2 n=5	2.8 ±0.2 HEUVELS		
Schw.	5.0 ±0.4 n=11		0.9 ±0.18 n=4		0.5 ±0.04 n=3			
Hund	6.8 ± 0.9 n=9						0.65 ± 0.13 n=5	
Katze	5.7 ± 1.0 n=5						1.7 ± 0.2 n=3	
Kanin	4.7 ± 1.3 n=4	11.2 ± 1.2 HEUVELS		0.9 ± 0.07 HEUVELS			3.8 ± 0.6 n=6	3.7 ± 0.2 HEUVELS

Tabelle 2: Enzymaktivitäten der GSH-POD [IE/g frisch] in den Geweben des Auges.

3.4. KANINCHEN

Es gibt einen Literaturvergleichswert von HEUVELS (59) für das Corneaepithel und die Bindehaut. Wobei der Bindehautwert dem hier angegebenen entspricht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die GSH-POD Aktivitäten in den Corneaepithelien aller Versuchstiere weitaus höher sind als in den übrigen Geweben des Auges. Warum allerdings das Rind eine so viel höhere Enzymaktivität der GSH-POD im Corneaepithel aufweist als alle anderen Versuchstiere, ist unklar.

Nach KINOSHITA (72) liegt der PPZ beim Kaninchencorneaepithel bei 70 % des Glucoseabbaues, während für das Rindercorneaepithel nur ein Wert von 35 % angegeben wird.

4. Ergebnisse der Proteinbestimmung

Die Biuretmethode wurde wegen der Kürze und Einfachheit des Analysenganges angewandt. Jedoch hat sie den Nachteil, daß sie verhältnismäßig unempfindlich ist; d.h. es handelt sich nur dann um die Methode der Wahl, wenn genügend Material zur Verfügung steht. Wenn die Extraktmenge unter 0,1 ml absinkt, werden, wie aus den Standardabweichungen hervorgeht, keine zufriedenstellenden Werte mehr gewonnen.

Eine positive Reaktion auf Biuret geben nicht nur Proteine, sondern alle organischen Stoffe mit mehr als zwei Carbamylgruppen, so auch Peptide und ihre Spaltprodukte. MAIER (86) und HILDEBRANDT (61) führten deshalb eine zusätzliche TCA-Fällung durch. Bei Hornhäuten von Schweinen und Kaninchen fanden sie allerdings keine signifikante Abnahme des Proteingehaltes. Inwieweit das auch für Bindehaut, Linse und Retina zutrifft, bleibt zu

prüfen, denn SCHWEER und POOK (117) fanden für ihre Glaskörperfiltrate nach TCA-Fällung im Mittel 54 ± 2.6 % niedrig liegendere Eiweißwerte.

In einer Tabelle wurden die eigenen Werte Literaturvergleichswerten gegenübergestellt.

4.1. RIND

CORNEAEPITHEL. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert zeigt gute Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Werten.

LINSE. Es liegt nur ein Vergleichswert von HEUVELS vor: 135.0 mg/frisch (59). Der hier gefundene Wert liegt fast um das Doppelte darüber. Die so unterschiedlichen Werte können einmal durch das verschiedene Alter der Tiere bedingt sein, zum anderen wandte HEUVELS(59) eine andere Präparationstechnik an.

RETINA. Dieser Wert entspricht zwar dem von HEUVELS (59) ermittelten, zeigt jedoch eine Standardabweichung von 20 %. Das mag zum Teil ein methodischer Fehler sein (zu geringer Extrakteinsatz), kann aber auch auf die möglicherweise zu geringe Anzahl der Bestimmungen (n = 4) zurückgeführt werden.

Bei der Präparation der Retina konnte fast nie vermieden werden, auch eine gewisse Menge Glaskörper miteinzufrieren. Daher könnte der hier angegebene Eiweißgehalt für die Retina zu niedrig liegen.

4.2. SCHWEIN

CORNEAEPITHEL. MAIER (86) und HILDEBRANDT (61) haben zwar mit der gleichen Methode gearbeitet. Dennoch liegt dieser Wert von 76.3 ± 6.7 um 35 % unter dem hier ermittelten.

LINSE. Es liegt kein quantitativer Vergleichswert aus der Literatur vor.

		Vergleichswerte aus der Literatur							
	Eigene Werte	Anderson	Delbrück	French, Duma	Heuvels	Kawerau, Ott	Reim, Schramm	Reim et al.	Henning-hausen
Rind	70.0 ±3.0 n=6	64.6	48.2		60.0	95.8		145.0	
Schw.	102.0 ±6.6 n=9								
Hund	53.0 ± 5.2 n=7								
Katze	42.0 ± 11.5 n = 3							76.3	131.5
Kanin.	65.0 ± 3.2 n= 5			265.0 156.0	117.3		115.0		157.0

Tabelle 3: Proteingehalte [mg/g frisch] im Corneaepithel.

4.3. HUND

CORNEAEPITHEL. Der einzige Wert aus der Literatur liegt mehr als doppelt so hoch: 131.5 ± 1.8 (56). Bei diesen Messungen war der Extrakteinsatz allerdings nicht zu gering. Die Anzahl der Messungen betrug n = 7 (ohne Doppelbest.). Dennoch liegt die Standardabweichung bei 20%.

CONJUNCTIVA. Auch hier liegen keine Vergleichswerte aus der Literatur vor. Die hohe Streuung der Werte kann wiederum Ausdruck des zu geringen Extrakteinsatzes und der kleinen Anzahl der Bestimmungen n = 3 sein. Wie in III. 3.2. bereits ausgeführt, ist der Proteingehalt in der Konjunktiva stark abhängig von Ort und Art der Präparation. Am Limbus sind viele Epithellagen, während peripher nur knapp ein bis drei Zellschichten vorhanden sind.

Eine Verfälschung der Werte kann außerdem durch die Ermittlung eines falschen Gewebegewichtes infolge wechselnden H_2O-Gehaltes des subkonjunktivalen Gewebes bedingt sein. Dieses ist undefinierbar im Hinblick auf Relation von Zellen zu extrazellulärer Matrix sowie zum H_2O-Gehalt der Matrix.

4.4. KANINCHEN

CORNEAEPITHEL. Alle Literaturwerte liegen zweimal so hoch wie der hier gemessene Wert.

Allerdings handelt es sich hier um UV-bestrahlte Tiere (102), die einer Versuchsreihe zur Erzeugung der Keratitis photoelectrica angehörten. So ist dieses Epithel eher als regenerierendes Hornhautepithel anzusehen.

Hierfür findet HENNINGHAUSEN (56) einen Wert von 88.0 ± 1.3.

CONJUNCTIVA. Der von HEUVELS (59) angegebene Wert liegt nur wenig höher bei gleicher Analysenmethode.

Im übrigen gelten auch hier ähnliche Bedenken wie bei der Hundebindehaut.

4.5. KATZE

CORNEAEPITHEL. Es gibt wiederum keine Vergleichswerte aus der Literatur. Auch hier kann es sich nur um eine vorläufige Schätzung handeln, da die Zahl der Bestimmungen zu gering (n = 3) und die Standardabweichung mit 25 % extrem hoch ist.

V. DISKUSSION

1. Methodische Betrachtungen

1.1. Zur Präparation der Gewebe

Die Methode zur jeweiligen Gewebepräparation wurde in den entsprechenden Kapiteln ausführlich geschildert.

Zu befriedigenderen Aktivitätsmessungen der GSH-POD wird man sicher gelangen, wenn man feinere Präparationsbedingungen für die Gewebe anwendet. Dies gilt besonders für die Linse und die Bindehaut.

REIM und HEUVELS (105) weisen darauf hin, daß sich die GSH-POD nur im Linsenepithel befindet. HOLMBERG (64) hingegen zeigt, daß sich die spezifische Aktivität des angereicherten Enzyms im Epithel, Rinde und Kern der Rinderaugenlinse annähernd gleich verhält.

HERRMANN und MOSES (58), HOCKWIN et al. (63) sowie KLEIFELD und HOCKWIN (74) haben die Verteilung des GSH in der Linse untersucht. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß die Linsenperipherie (Äquator > vordere Schale > hintere Schale > Kern) weit mehr GSH enthält als der Kern.

Da nun das Glutathion Donorsubstrat der GSH-POD ist, kann man annehmen, daß es sich mit der Aktivitätsverteilung des Enzyms ebenso verhält. Demnach wären die Ergebnisse von HOLMBERG (64) mit Zurückhaltung zu betrachten.

Für die Konjunktiva gelten die schon besprochenen Bedenken, die im Kapitel über die Ergebnisse zur Proteinbestimmung ausgeführt wurden. Außerdem wäre anzuführen, daß die hier angewandte Methode der Homogenisierung für diese Gewebeart evtl. nicht ausreichend ist.

1.2. Zur Standardisierung des Testes

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der GSH-POD mit einer Methode, die leicht und ohne hohen apparativen Aufwand durchzuführen ist, bestimmt.

Diese von PAGLIA und VALENTINE (97) erstmals angewandte Methode wurde auch von FLOHÉ und seiner Arbeitsgruppe, die sich sehr eingehend mit der Problematik des Enzyms beschäftigt hat, als ausreichende, wenn nicht gar als die beste Art bezeichnet, um Aktivitätsmessungen an biologischem Material durchzuführen.

Wie von FLOHÉ und BRAND (34) ausgeführt, ist dieser enzymatisch-gekoppelte Test jedoch sehr störanfällig und bedarf besonderer Vorsichtsmaßnahmen. Er liefert auch nur unter genau definierten Bedingungen befriedigende Ergebnisse. Die Anwendung dieser Methode wird limitiert durch die speziellen Eigenschaften des Enzyms und des Hilfsenzyms GR.

1.2.1. Glutathion

Die GSH-Konzentration darf nicht zu hoch sein, da es sonst zu einer Produkthemmung der GR kommt. Außerdem zeigt die GR eine Substrathemmung durch NADPH bei geringen GSSG-Konzentrationen.

Entgegen den Ergebnissen von REIM und HEUVELS (105) wurde daher die GSH-Konzentration auf 1 mM im Test gesenkt - wie von FLOHÉ und BRAND (34) empfohlen. REIM und HEUVELS (105) kamen noch bei 4 mM GSH-Konzentration zu gut reproduzierbaren Ergebnissen.

Die GSH-Oxidation wird außerdem von einer Vielzahl von Substanzen katalysiert, z.B. von SH-Verbindungen, von Disulfiden, von Übergangsmetallen und

von anderen redoxaktiven Proteinen (29). Bei Aktivitätsmessungen der GSH-POD aus ungereinigtem Gewebe, wie in dieser Arbeit, sollte man daher eigentlich durch eine orientierende Charakteristik feststellen, ob die beobachtete Reaktion wirklich durch die GSH-POD verursacht wird.

1.2.2. t-Bhp

Die Konzentration des Peroxids wurde ebenfalls entgegen den Angaben von REIM und HEUVELS (105) verändert. Die t-Bhp-Konzentration wurde auf 1 mM heraufgesetzt, um sicherzustellen, daß seine Konzentration während des Testes nicht unter den Sättigungsbereich abfiel.

Alle Arbeitsgruppen, die die GSH-POD in der Leber oder im Erythrozyten bestimmten und als Peroxid H_2O_2 verwandten (17,38,39,44,80,91,97), mußten die Catalase inhibieren. Nach FLOHE (27) kann nämlich das Enzym unter physiologischen Bedingungen mit der Catalase um das gemeinsame Substrat H_2O_2 konkurrieren. Dies ist einer der Gründe, weshalb SIES,GERSTENECKER, MENZEL, FLOHÉ (114) das H_2O_2 durch t-Bhp ersetzten. Dieses Peroxid reagiert nicht mit Catalase. GÜNZLER et al. (46,52) machten außerdem Untersuchungen zur Reaktion der GSH-POD mit verschiedenen Peroxiden. Sie bestimmten die Geschwindigkeit der GSH-POD-Reaktion mit Äthyl-, Cumolhydroperoxid und t-Bhp. Alle diese Peroxide haben eine relativ geringe spontane Reaktionsrate mit GSH im Gegensatz zum H_2O_2. Die Abstufung der spontanen Reaktionsneigung der Peroxide erfolgt - wie sie sich in der nicht enzymatischen Oxidation von GSH äußert - in der Reihenfolge H_2O_2 > Äthylhydroperoxid > Cumolhydroperoxid > t-Bhp. Die Maximalgeschwindigkeit bei konstanter GSH-Konzentration ist unabhängig von der Natur des Peroxids.

GÜNZLER at al. (46,52) erklärten die unterschiedlichen Reaktionsraten der Peroxidase mit den oben genannten Peroxiden durch deren zunehmende Reaktionsträgheit (sterische Abschirmung), also nicht durch eine veränderte Neigung zur Bildung eines spezifischen Enzym-Substrat-Komplexes.

Da die Cornea und die Linse nur geringste Mengen an Catalase (10,123) enthalten, ist der erste Punkt, der für das t-Bhp spricht, für die beiden Gewebe des Auges nicht so entscheidend. Inwieweit das allerdings auch für die Bindehaut zutrifft, bleibt zu prüfen. Entscheidend ist, daß das t-Bhp die geringste spontane Reaktionsneigung von allen Hydroperoxiden hat und daher für eine in-vitro-Testung der GSH-POD besser geeignet ist als H_2O_2. Es liefert bessere Aktivitätswerte (51).

1.3. Zum Literaturvergleich

FLOHÉ et al. (33,34,42) und HOLMBERG (64) kamen zu dem Ergebnis, daß die GSH-POD nicht mit Donorsubstrat gesättigt werden kann, bis hin zu 16 mM GSH. Deshalb ist es bei einem Vergleich von Ergebnissen aus der Literatur notwendig darauf zu achten, welche Substratkonzentrationen im Test eingesetzt wurden; abgesehen davon, daß natürlich auch Aussagen, die aus Versuchen mit dem gereinigten Enzym und die aus biologischem Material gemacht wurden, nur schwer miteinander zu vergleichen sind. Das gleiche gilt selbstverständlich für unterschiedliche Testmethoden.

FLOHÉ, LOSCHEN, GÜNZLER (45) fügten ihren Aussagen aus früheren Publikationen bei, daß die Reaktionsrate der GSH-POD in vivo nicht immer eine Reaktionskinetik

erster Ordnung zeigt, nämlich dann nicht, wenn H_2O_2 in Konzentrationen von nM und µM vorhanden ist.

Die Zusammensetzung der hier angegebenen Konzentrationen erfolgte also nur aus kinetischen, reaktionsmechanistischen Eigenschaften des Enzyms, seiner Substrate, des Hilfsenzyms GR und der daraus folgenden Störanfälligkeit des Testsystems. Entgegen der von REIM und HEUVELS (105) propagierten physiologischen Testzusammensetzung wurde es für weitaus besser erachtet, Rücksicht auf die besondere Kinetik des Enzyms zu nehmen, weil nur dann mit dem gekoppelt-enzymatischen Test eine relativ gute Reproduzierbarkeit zu erlangen ist.

Die hier erhaltenen Aktivitätswerte für die Gewebe des Auges bei allen Versuchstieren zeigen, daß die GSH-POD in der Cornea bei weitem am höchsten liegt. Erst dann folgen Retina und Linse. Diese Ergebnisse sind daher nicht in Einklang zu bringen mit den Selengehaltsangaben in den Augengeweben, die TAUSSKY et al. (118) gemacht haben.

Nur in einem Punkt kann mit TAUSSKY et al. (118) Übereinstimmung gefunden werden. Diese Autoren geben einen höheren Selengehalt für die Retina als für die Linse an. Das würde den in dieser Arbeit gemessenen GSH-POD Aktivitäten und den von HEUVELS ermittelten Werten entsprechen.

ROTRUCK et al. (111) und SMITH et al. (115) zeigten, daß die GSH-POD Aktivität parallel zum Selengehalt des Gewebes ist. SMITH et al.(115) zeigten auch, daß experimentelle Selenzugaben bei Ratten die GSH-POD Aktivität steigern konnten. Außerdem führte FLOHÉ (persönliche Mitteilung Marburg 1973) aus, daß Selenmangelratten an hämolytischer Anämie erkrankten.

2. Biologische Fragestellungen

Die biologische Funktion der GSH-POD wird je nach Gewebe und Zielsetzung der verschiedenen Arbeitsgruppen nicht immer einheitlich beurteilt.

2.1. Leber

FLOHÉ, SCHLEGEL, SCHAICH (38) zeigten, daß an einer funktionellen und chemischen Identität der GSH-POD aus Leber und Erythrozyten nicht zu zweifeln ist.

Die GSH-POD scheint eine Schlüsselposition zu haben zur Erhaltung der funktionellen Integrität von Membranen der Zelle selbst sowie ihrer Mitochondrien (27,93). Sie schützt SH-Gruppen von Enzymen und Strukturproteinen. Vor allem die Bedeutung des Enzyms zum Schutze der Membranlipide vor oxidativer Zerstörung kann in den Lebermitochondrien als erwiesen angesehen werden. Diese enzymatische Funktion war lange Zeit unklar, insbesondere, auf welche Weise das Enzym die irreversible Membranschädigung verhindern kann. Aus zahlreichen Untersuchungen von LITTLE und O'BRIEN (79,80) geht hervor, daß dieses Enzym nicht nur H_2O_2, sondern auch Peroxide ungesättigter Fettsäurenreduziert.

Organische und anorganische Substanzen, die intrazellulär entstehen, sind fähig, eine irreversible Denaturation von essentiellen zellulären Proteinen zu verursachen; Zellmembranlipide werden zu toxischen Peroxiden. Solche Substanzen können z.B. auch im Auge bei Bestrahlung, in Gegenwart von O_2 und leicht oxidierbaren Substanzen, wie Ascorbinsäure, entstehen (105).

Durch Reduktion eben dieser Lipidhydroperoxide kann die GSH-POD eine Schädigung von Enzymen oder Membranproteinen durch die peroxidierten Lipide verhindern (23,80,96). Eine weitere Schädigung der Membran wird verhindert, sie bleibt funktionstüchtig.

Daneben soll die GSH-POD in der Leber auch bei der H_2O_2- Eleminierung eine Rolle spielen und in den PPZ eingreifen (62).

2.2. Erythrozyt

Dem reduzierten Glutathion kommt auch im Erythrozyten eine wesentliche Bedeutung zur Erhaltung der Zellintegrität zu. Es schützt das Hämoglobin gegen oxidative Prozesse. Auch für den Erythrozyten wurde zunächst angenommen, daß die wesentliche Funktion des Enzyms darin besteht, gemeinsam mit dem GSH der H_2O_2-Schädigung entgegenzuwirken. Entsprechend dieser Hypothese wurde lange Zeit darüber diskutiert, ob das intraerythrozytäre H_2O_2 eher durch die Catalase oder durch die GSH-POD abgebaut wird. COHEN und HOCHSTEIN (17) zeigten zunächst, daß der GSH-POD bei H_2O_2 Konzentrationen unter 3 μM eine größere Bedeutung zukommt als der Catalase. NICHOLLS (94) wies jedoch darauf hin, daß die Catalase in der Lage ist, unter physiologischen Bedingungen H_2O_2 in ausreichender Geschwindigkeit zu eleminieren.

Nach dem jetzigen Forschungsstand nimmt man an, daß H_2O_2 in niedrigen Konzentrationen über beide Enzymsysteme mit gleichen Geschwindigkeiten verstoffwechselt werden kann.

Die GSH-POD kann daher auch die Catalase - bei genügendem GSH-Angebot - funktionell ersetzen, wie auch die relative Stabilität von Akatalasie Erythrozyten zeigt (1).

Dem steht entgegen, daß umgekehrt die Catalase die GSH-POD nicht voll ersetzen kann. Es ist daher anzunehmen, daß auch im Erythrozyten nicht das H_2O_2 als entscheidendes Substrat dieses Enzyms betrachtet werden darf. Als zusätzliches Substrat müssen Produkte aus radikalisch verlaufenden Autoxidationsprozessen dienen. - Hydroperoxide von Lipiden (69).

1956 wurde erstmals durch CARSON und seine Mitarbeiter (15) festgestellt, daß ein genetischer Mangel an Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in den Erythrozyten mit einer erhöhten Bereitschaft zu hämolytischen Krisen einhergeht. Das klinische Bild ist außerdem gekennzeichnet durch Heinz'sche Innenkörperbildung der Erythrozyten und Reticulocytose. Zur Manifestation bedarf es jedoch erst einer Belastung des Erythrozytenstoffwechsels, z.B. durch die Inhaltsstoffe der Vicia faba. Man nimmt an, daß die schädigende Wirkung der Saubohne durch die Stoffe Divicin und Isouramil zustande kommt, die das intraerythrozytäre GSH zerstören (37). Die gesteigerte Anfälligkeit von G-6PDH Mangelträgern soll auf die verminderte Reduktionsfähigkeit von Glutathion zurückzuführen sein. Die oben beschriebenen klinischen Symptome wurden bisher bei allen Enzymdefekten, die eine Verminderung des GSH-Spiegels zur Folge haben können, nachgewiesen. Neben dem schon genannten G-6PDH-Mangel kommt ein 6-Phosphogluconatdehydrogenasemangel (13), ein Glutathion-Reduktasemangel (82,119) und ein Glutathion-Synthetasemangel (8,12) in Frage.

Da diese Enzymdefekte und ein isolierter Mangel an GSH-POD (93) zu ähnlichen klinischen Bildern führen, liegt es nahe anzunehmen, daß die pathophysiologischen Erscheinungen auf der verminderten Umsatzrate der GSH-POD beruhen. Wenn man das Reaktionsschema (Abb.1) betrachtet, so kann man daraus entnehmen, daß die GSH-POD den letzten Schritt einer Reaktionsserie katalysiert, deren einzige Funktion zu sein scheint, die Erythrozytenmembran vor einer Akkumulation von H_2O_2 oder auch vor der Schädigung von Lipidperoxiden zu schützen, deren Folge eine Hämolyse wäre.

Es ist bekannt, daß der PPZ für den reifen Erythrozyten der einzige Weg der Glucoseoxidation ist und damit auch die alleinige Möglichkeit zur NADPH-Gewinnung bietet. Daher ist diesem Stoffwechselgang besondere Bedeutung beizumessen, da z.B. bei G-6PDH-Mangel zu wenig NADPH geliefert wird und so auch das Glutathion nicht mehr reduziert werden kann; der oxidative Schutz ist nicht mehr gesichert, d.h., der PPZ limitiert mit seinen Enzymen G-6PDH und 6-PGDH NADPH abhängige Schritte (68).

Im reifen Erythrozyten kommt als NADPH abhängiger Schritt im Stoffwechsel nur dieses Glutathionssystem in Frage, da der Zitronensäurezyklus und eine Fettsäuresynthese fehlen.

Aus dem vorher Gesagten kann man entnehmen, daß die GSH-POD eine Schlüsselstellung im Erythrozytenstoffwechsel einnimmt, weil sie die Peroxide eleminiert. Es wird auch verständlich, daß das Krankheitsbild mit einem GSH-POD-Mangel dem der anderen Schlüsselenzyme im PPZ ähnelt - hämolytische Krisen, bei Neugeborenen Gelbsucht.

2.3. Auge

Die biologische Funktion der Glutathion Peroxidase, des Glutathion und die gegenseitige Abhängigkeit des PPZ und des Glutathionsystems wurde am Beispiel der Leber und des Erythrozyten so ausführlich dargestellt, da sich nach den bisherigen Forschungsergebnissen in der Ophthalmologie zeigt, daß diesenFaktoren im Metabolismus der Augengewebe eine ähnlich wichtige Stellung zukommt.

Über die physiologische Bedeutung der GSH-POD,der Leber und des Erythrozyten wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen intensiv geforscht; es liegen jedoch weit

weniger Arbeiten über diese Fragestellungen in den Geweben des Auges vor. Daher können auch hier nur wiederum mögliche Zusammenhänge anhand von theoretischen Überlegungen diskutiert werden.

Die Catalase ist weder in der Cornea (10) noch in der Linse in wesentlichen Konzentrationen nachzuweisen (123). Somit kommt möglicherweise der GSH-POD als einzigem H_2O_2 abbauendem Enzym eine noch bedeutendere Rolle zu als im Erythrozyten und in der Leber.

Von PIRIE (99) wurde bereits 1965 festgestellt, daß das H_2O_2, das durch Autoxidationen im Kammerwasser entsteht, mit Hilfe des GSH und der GSH-POD in der Linse abgebaut wird. Durch das Vorhandensein dieses Enzyms käme die toxische Wirkung des H_2O_2 nicht zum Tragen. Der hohe GSH-Gehalt der Linse (10 mM) in dem nicht sehr aktiven Gewebe wäre somit verständlich.

Für die Cornea wurde von HERRMANN und MOSES (58), ANDERSON und SPECTOR (3), REIM, BEERMANN, LUTHE (103) sowie von REIM und ASHAUER (102) der GSH-Gehalt bestimmt.

Die Bedeutung des GSH-Spiegels für die Transparenz der Linse wurde von WALEY 1959 (19) im Symposium on Glutathione und von KINOSHITA (71) hervorgehoben. Danach besteht eine direkte Beziehung zwischen der Transparenz der Linse und ihrem Gehalt an Glutathion. Untersuchungen an getrübten Linsen ergaben, daß das Ausmaß der Linsentrübung direkt proportional zu einer verminderten GSH-Konzentration war (21).

Daß die Linse die Fähigkeit hat, GSH zu synthetisieren, wurde bereits in der Einleitung erwähnt, ebenso, daß bisher eine Glutathionsynthese in der Cornea nicht nachgewiesen worden ist. Obwohl die große Menge GSH im Corneaepithel nur dort synthetisiert werden kann.

KINOSHITA (72) führte aus, daß der Stoffwechsel der Linse bemerkenswert ähnlich dem des Erythrozyten ist. Beide Gewebe gewinnen den Hauptteil ihrer Energie aus der anaeroben Glykolyse. Auch haben beide hohe Konzentrationen an spezialisierten Proteinen, die sie gegen Oxidation schützen müssen. Wenn dieser Schutz nicht mehr gewährleistet werden kann, wird das Gewebe funktionsuntüchtig.

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß in allen Geweben des Auges auch H_2O_2 als Stoffwechselprodukt anfällt und GSH als Reaktionspartner dient, so kann gemeinsam mit der GSH-POD das Peroxid verstoffwechselt werden. Die Rückführung des oxidierten GSSG ist aber abhängig von dem Enzym Glutathion-Reduktase und der Anlieferung von NADPH.

Diese Abhängigkeit wurde bereits in der Einleitung dargestellt. Wird nun genug NADPH angeboten, so kann die GR zur Rückverwandlung des GSSG zu GSH dieses Angebot voll ausnutzen. Es ist sogar so, daß durch diesen Reaktionsschritt der PPZ limitiert werden könnte, da dadurch auch wieder NADP neu angeboten wird. Andererseits wird bei ungenügendem Angebot von NADPH das Glutathionsystems zusammenbrechen.

Aus den Untersuchungen von LUTHE (85), den theoretischen Überlegungen von KINOSHITA (72), HOLMBERG (64), von BEUTLER und SRIVASTAVA (9) kann man herleiten, daß die intakte Struktur und Transparenz der Augenlinse und der Cornea wahrscheinlich nur dann gewährleistet ist, wenn das Glutathionsystems funktioniert und genügend NADPH über den PPZ gebildet wird.

In dem Kapitel über den Erythrozyten wurde dargestellt, daß es angeborene Krankheitsbilder gibt,

bei denen durch einen Enzymmangel nicht genug NADPH gebildet wird (G-6PDH,6-PDH) oder aber es fehlen Enzyme des Glutathionsystems (GR, GSH-POD, GSH-Synthetase). Alle diese Krankheiten zeichnen sich bei Belastung des Systems durch hämolytische Krisen, Heinzkörperbildung und Gelbsucht aus.

Wenn nun von diesem Enzymmangel auch die Linse betroffen ist, kann, wie oben ausgeführt, das oxidierte Glutathion nicht mehr in den funktionstüchtigen, reduzierten Zustand zurückgeführt werden. Dadurch dürfte einer Kataraktbildung Vorschub geleistet werden. Wann ein isolierter G-6PDH-Mangel, der wohl primär immer im Erythrozyten entdeckt wird, auch zu einer Linsentrübung führt, bleibt dahingestellt. Rein theoretisch kann man jedoch sagen, daß dies abhängig ist von der Aktivitätsminderung des Enzyms in der Linse. Wahrscheinlich kann diese Kataraktbildung auch durch toxische Einflüsse provoziert werden, ähnlich wie beim Erythrozyten.

Klinische Beobachtungen stützen diese theoretischen Überlegungen. So beschrieben HARLEY, ROBIN et al.(54), HELGE und BORNER (55) sowie ZINKHAM (125) je ein Kind mit angeborenem G-6PDH-Mangel und Kataraktbildung. HELGE und BORNER (55) wiesen bei ihrem Patienten ein völliges Fehlen der G-6PDH im Linsenstoffwechsel nach, ebenso ZINKHAM (78).

Genauere Angaben über das gleichzeitige Vorkommen von G-6PDH-Mangel und Kataraktbildung oder die Cornea betreffende Krankheiten sind in Zukunft zu erwarten, da die wechselseitige Abhängigkeit des Glutathionsystems und des PPZ nun auch für die Ophthalmologie bekannt ist. Das gleiche gilt für alle anderen in das Glutathion-Pentose-Phosphatsystem eingreifenden Enzyme - besonders für die GSH-POD.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde für einen gekoppelt-enzymatischen Test eine Standardtestzusammensetzung zur Aktivitätsbestimmung der Glutathion Peroxidase ermittelt.

Die Standardtestzusammensetzung wurde abgeleitet aus der besonderen Kinetik dieses Enzyms und den Eigenschaften des Hilfsenzyms. Außerdem dienten die in der Literatur gemachten Angaben als richtungsweisend, besonders die Hinweise aus der Arbeitsgruppe FLOHÉ (GÜNZLER,W. persönliche Mitteilung 1973). Die optimale Konzentration von GSH und Peroxid wird in dieser Arbeit mit jeweils 1 mM im Inkubationsansatz angegeben.

Damit wird nach dem hier für die Augengewebe ermittelten K_m-Wert für t-Bhp von 3 - 8 x 10^{-5} M zwischen 15 - 30 facher K_m-Konzentration gemessen.

Die Reproduzierbarkeit dieser ermittelten Testzusammensetzung wurde dann in Reihenuntersuchungen an Augengeweben verschiedener Tierarten überprüft. Die erhaltenen Aktivitätswerte wurden, soweit dies möglich war, mit der Literatur verglichen.

An Hand einer Darstellung der Bedeutung des GSH, der GSH-POD und der Verbindung des Glutathionsystems zum Pentosephosphat-Zyklus und der durch die Entgleisung entstehenden pathophysiologischen Phänomene im Erythrozyten wurde versucht, einen Hinweis für die Erkrankungen des Auges zu geben. Es wurden Parallelen im Stoffwechsel der beiden Gewebe aufgezeigt und zu erwartende Miterkrankungen des Auges angedeutet.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AEBI, H. und SUTER, H.: Über die Peroxidempfindlichkeit von Akatalasie-Erythrozyten. Humangenetik 2, 328-343 (1966)

2. ANDERSON, E.I.: Proteolytic activity of bovine corneal epithelial extracts. Invest.Ophthal. 6, 348-355(1967)

3. ANDERSON, E.I.and SPECTOR, A.: Oxidation-reduction reactions involving ascorbic acid and the hexosemonophosphat shunt in corneal epithelium. Invest.Ophthal. 10, 41-53 (1971)

4. BARTLEY, BIRT, BANKS: Biochemie. Eine Einführung für Mediziner. Kap. 15: Das Auge. Verlag Chem. GmbH.John Wiley & Sons ltd. 1970

5. BEISENHERZ,G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, TH., CZOK,R., GARBADE, K.H., MEYER-AREND, E. und PFLEIDERER, G.: Diphosphofructoaldolase, Phosphoglyceraldehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

6. BERGMEYER, H.-U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim/ Bergstr. 1970

7. BEUTLER, E.: The hemolytic effect of primaquine and related compounds on red blood cells. Blood, 14, 103-112 (1959)

8. BEUTLER, E.: Drug induced hemolytic anemia. Pharmacol.Rev. 21, 73-103 (1969)

9. BEUTLER, E. und SRIVASTAVA, S.K.:

The role of Glutathione in the lens.
in: Symposium on Glutathione ed.Flohé, Benöhr, Waller et al, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974

10. BHUYAN, K. and BHUYAN,D.:

Catalase in ocular tissue and its intracellular distribution in corneal epithelium.
Amer.J. Ophthal. 69, 147-153 (1970)

11. BOGUSLAWSKA-JAWORSKA, J. and KAPLAN, J.:

A simple screening test for Glutathione Peroxidase activity in red cells.
Clin.Chim.Acta 26, 459-463 (1969)

12. BOIVIN, P., GALAND C.: La synthèse du glutathion au cours de l'anémie hemolytic congénitale avec déficit en glutathion reduit.
Nouv.Rev.franc. Hémat. 5, 707-720 (1965)

13. BREWER, G.J., DERN,R.: A new inherited enzymatic deficiency of human erythrocytes: 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency.
Amer.J. hum.Genet. 16, 472-476 (1964)

14. BÜCHER, Th., LUH, W. und PETTE, D.:

Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden.
In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
10.Aufl.Bd.VI; Teil A 292-339 (SPRINGER-Verlag, BERLIN/GÖTTINGEN/HEIDELBERG/NEW YORK 1964)

15. CARSON, P., FLANAGAN C. et al:

Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes.
Science 124, 484-485 (1956)

16. COHEN, G. and HOCHSTEIN, P.:
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and detoxication of H_2O_2 in human erythrocytes
Science 134, 1756-1757 (1961)

17. COHEN, G. and HOCHSTEIN, P.:
Glutathione Peroxidase: The primary agent of the elemination of H_2O_2 in human erythrocytes.
Biochem. 2, 1420-1428 (1963)

18. COLOWICK, S., SCHWARZ, D.R. et al.:
GLUTATHIONE
Proc. of the symposium held at Ridgefield Conn., Nov.1953
New York: Acad.Press 1954

19. CROOK, E.M.: GLUTATHIONE Symposium
Held in London 1958; Cambridge at the University Press 1959

20. DARDENNE, U.: Stoffwechselvorgänge in der Linsenkapsel und ihre Abhängigkeit vom Lebensalter.
Ber.dtsch.ophthal.Ges. 59, 183-188 (1955)

21. DAVSON, H.: The Eye
Vegetative Physiology and Biochemistry.
Acad.Press.New York/London
Vol.1, 2nd Edition 1969

22. DELBRÜCK, A.: Untersuchungen über Enzyme des Energiestoffwechsels im Bindegewebe.
Klin.Wschr. 40, 677-684 (1962)

23. DESAI, I., TAPPEL,A.: Damage to proteins by peroxidized lipids.
J.Lipid. Res. 4, 204-207 (1963)

24. DISCHE, Z., EHRLICH, G., MUNOZ, A.B., SALLMANN, L.:
The content in Glutathione and nucleotides of the lens capsule and its relation to lens permeability.
Amer.J. Ophthal. 36, 54-64(1953)

25. EULER, H. von, MARTUIS, C.:

Über den Gehalt der Augenlinsen an Sulfhydrylverbindungen und Askorbinsäure.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 222, 65-69 (1933)

26. FINK, H. und HOCKWIN, O.:

Kohlenhydratstoffwechsel der Linse in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Albrecht v.Graef. Arch.Ophthal 191, 177-195 (1974)

27. FLOHÉ, LEOPOLD: Kinetik und biologische Funktion der Glutathion Peroxidase.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.350, 1181 (1969)

28. FLOHÉ, LEOPOLD: Reindarstellung und Charakterisierung der Glutathion Peroxidase aus Rindererythrozyten.
Habilitationsschrift Tübingen 1970

29. FLOHÉ, LEOPOLD: Polarographische Bestimmung der Glutathion Peroxidase.
Fortschritte der Klin.Chem.,Enzyme und Hormone 97-102 (1971)
Verlag d. Wiener Med.Akademie, Wien

30. FLOHÉ, LEOPOLD: Die Glutathion Peroxidase: Enzymologie und biologische Aspekte.
Klin. Wschr. 49, 669-683 (1971)

31. FLOHÉ, L., BENÖHR, H.CHR., WALLER, H.D.:

Symposium on Glutathione (Abstracts)
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.354, 825-838 (1973)

32. FLOHÉ, L., BENÖHR, H.CHR., SIES, H., WALLER, H.D., WENDEL,A:

GLUTATHIONE
Proc. of the 16th Conf.Germ.Soc. Biol.Chem. Tübingen, March 1973.
Georg Thieme, Stuttgart 1974

33. FLOHÉ, L. and BRAND, I.:

Kinetics of Glutathione Peroxidase.
Biochem.Biophys.Acta 191, 541-549 (1969)

34. FLOHÉ, L. and BRAND, I.:

Some hints to avoid pitfalls in quantitative determination of Glutathione Peroxidase.
Z.Klin.Chem. Klin. Biochem. 8, 156-161 (1970)

35. FLOHÉ, L., GERSTENECKER,CHR., MENZEL,H., SIES, H.:

Oxidation in the NADP System and release of GSSG from Hb-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of GSH by hydroperoxides.
Febs Letters 27, 171-175 (1972)

36. FLOHÉ, L., GÜNZLER, W., SCHOCK, H.H.:

Glutathione Peroxidase: A Selenoenzyme.
Febs Letters 32, 132-134 (1973)

37. FLOHÉ, L., NIEBCH, G., REIBER, H.:

Zur Wirkung von Divicin in menschlichen Erythrozyten.
Z.Klin.Chem. Klin. Biochem. 9, 431-437 (1971)

38. FLOHÉ, L., SCHLEGEL, W., SCHAICH, E.:

Zur Frage der Identität von Glutathion Peroxidase aus Erythrozyten und Leber (Contraction factor I) der Ratte.
Z.Klin.Chem. Klin.Biochem. 8, 149-155 (1970)

39. FLOHÉ, L. and ZIMMERMANN, R.:

The role of Glutathione Peroxidase in protecting the membrane of rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Acta 223, 210-213 (1970)

40. FLOHÉ, L. und Mitarbeiter:

Glutathion Peroxidase I - VI

41. ———, EISELE, B., WENDEL, A.:

Glutathion Peroxidase I
Reindarstellung und Molekulargewichtsbestimmungen.
Hoppe Seyler's Z. Phys.Chem. 352, 151-158 (1971)

42. ———, GÜNZLER,W., JUNG,G., SCHAICH,E., SCHNEIDER,F.:

Glutathion Peroxidase II
Substratspezifität und Hemmbarkeit durch Substratanaloge.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 352, 159-169 (1971)

43. ———, SCHAICH,E., VOELTER,W., WENDEL,A.:

Glutathion Peroxidase III
Spektrale Charakteristika und Versuche zum Reaktionsmechanismus.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Che. 352, 170-180 (1971)

44. ———, SCHLEGEL, W.:

Glutathion Peroxidase IV
Intrazelluläre Verteilung des Glutathion Peroxidase-Systems in der Rattenleber.
Hoppe Seyler's Z. Phys.Chem. 352, 1401-1410 (1971)

45. ———, LOSCHEN,G., GÜNZLER,W., EICHELE, E.:

Glutathione PEROXIDASE V
The kinetic mechanism
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 353, 987-999 (1972)

46. GÜNZLER,W., VERGIN, H., MÜLLER, I., FLOHÉ, L.:

Glutathion Peroxidase VI
Die Reaktionen der Glutathion Peroxidase mit verschiedenen Hydroperoxiden.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 353, 1001-1004 (1972)

47. FRENCH, R.C. and DUMA, Z.:
Studies on protein metabolism of the cornea.
Canad.J. Biochem.Physiol. 41, 1005-1011 (1963)

48. FRIEDBURG, D. and MANTHEY, K.F.:
Glutathione and NADP linked enzymes in human senile cataract.
Exp. Eye Res. 15, 173-177 (1973)

49. GOLDSCHMIDT, M.: Die Autoxidation der normalen und pathologischen Linse.
Albrecht v. Graef
Arch.Ophthal. 113, 160-184 (1924)

50. GRAYMORE, C.N.: Biochemistry of the Eye.
Academic Press London-New York 1970

51. GÜNZLER, W.A.: Some critical remarks on the determination of Glutathione Peroxidase in blood.
in: Symposium on Glutathione
ed.Flohé, Benöhr, Waller et al.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974.

52. GÜNZLER, W., VERGIN, H., MÜLLER, J., FLOHÉ, L.:
Glutathion Peroxidase VI
Die Reaktion der Glutathion Peroxidase mit verschiedenen Hydroperoxiden.
Hoppe Seyler's Z. Phys.Chem.353, 1001-1004 (1972)

53. HALLIWELL, B.: Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase: Solutions to the Problems of living with Oxygen.
New Phythol. 73, 1075-1086 (1974)

54. HARLEY, J.D., ROBIN, H., MENSER, M., HERTZBERG,R.:
Cataracts in G-6-P-Dehydrogenase-Deficiency.
Brit.Med.J. 1, 421 (1966)

55. HELGE, H. und BORNER, K.:
Kongenitale nichtspärozytäre hämolytische Anämie, Katarakt und G-6-P-Dehydrogenase-Mangel.
Dtsch.Med.Wschr.91,1584-1590(1966)

56. HENNIGHAUSEN, W.U.: Enzymaktivitäten und Metabolitspiegel in der Cornea verschiedener Spezies. Inaugural-Diss. Marburg 1972

57. HERRMANN, H. and HICKMANN, F.H.:

Exploratory studies on the corneal metabolism. Bull.Johns-Hopkins-Hosp.82, 225-250 (1948)

58. HERRMANN, H. and MOSES, S.:

Content and state of Glutathione in the Tissues of the Eye. J.biol.chem. 158, 33-45 (1945)

59. HEUVELS, B.: Glutathion Peroxidase in verschiedenen Geweben des Auges bei Rind und Kaninchen. Inaugural Diss. Marburg 1973

60. HEYNINGEN VAN, R. and PIRIE, A.:

Reduction of Glutathione coupled with oxidative decarboxylation of malate in cattle lens. Biochem.J. 53, 436-444 (1953)

61. HILDEBRANDT, H.D.: Über die Bestimmung von verschiedenen Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im Epithel und Endothel der Cornea. Inaugural Diss. Marburg 1968

62. HOCHSTEIN, P. and UTLEY, H.:

Hydrogen Peroxide detoxication by Glutathione Peroxidase and Catalase in rat liver homogenates. Mol.Pharmacol. 4, 574-579(1968)

63. HOCKWIN, O., WINKLER, F., KORTE, I.:
Veränderungen im Glutathion und Ascorbinsäuregehalt von Rinderlinsen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Albrecht v. Graef.Arch. 192, 215-225 (1974)

64. HOLMBERG, N.J.: Purification and properties of Glutathione Peroxidase from bovine lens.
Exptl.Eye Res. 7, 570-580 (1968)

65. HOPKINS, F.G.: Biochem.J. 15, 286 (1921)

66. HOPKINS, J. and TUDHOPE, G.R.:
Glutathione Peroxidase deficiency with increased susceptibility to erythrocyte Heinzbody formation.
Clin.Scien.Mol.Med. 47, 643-647 (1974)

67. IWATA, S. and KINOSHITA, J.:
Mechanism of development of hereditary cataract in mice.
Invest.Ophthal. 10,504-512(1971)

68. JACOB, H. and JANDL, J.H.:
Glutathione in the regulation of the hexosemonophosphate pathway.
J.Biol.Chem.241, 4243-4250(1966)

69. JACOB, H. and LUX, S.:
Degradation of membrane phospholipids and thiols in peroxide hemolysis: Studies in Vitamine E deficiency.
Blood 32, 549-568 (1968)

70. KAWERAU, E. and OTT., H.:
The soluble proteins of the cornea, paper and immunelectrophoretic studies.
Exptl. Eye Res. 1, 137-144 (1961)

71. KINOSHITA, J.: Studies on the Glutathione in bovine lens.
Arch.Ophthal. 57, 266-274 (1957)

72. KINOSHITA, J.: Selected Topics in ophthalmic biochemestry.
Arch. Ophthal. 72, 554-572 (1964)

73. KINSEY, V.E. and MERRIAM, F.C.:
Studies on the crystalline lens. II. Synthesis of glutathione in the normal and cataractous rabbit lens.
Arch.Ophthal. 44, 370-380 (1950)

74. KLEIFELD, O. und HOCKWIN, O.:
Über den Glutathiongehalt der Linse.
Dtsch.Ophthal.Ges.in Heidelberg
Ber. 59, 188-193 (1955)

75. KOBLET, H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart
2.Aufl. 1971

76. KOLTHOFF, J.M. and MEDALIA, A.J.:
The reaction between ferrous iron and peroxides.III.Reaction with cumene hydroperoxid in aqueous solution.
J.Amer.Chem.Soc. 71, 3789-3792(1949)

77. KUCK, J.F.: Chemical constituents of the lens
In: Graymore, Biochemestry of the Eye, London-New York, Acad.Press 1970

78. LERMAN, S.: Enzymatic factors in experimental galactose cataract.
Science 130, 1473-1474 (1959)

80. LITTLE, C. and O'BRIEN, J.:
An intracellular Glutathione Peroxidase with a lipid peroxide substrate.
Biochem.Biophys.Res.Comm.31, 145-150 (1968)

81. LITTLE, C., OLINESCU, R., REID, K., O'BRIEN, P.:
Properties and Regulation of Glutathione Peroxidase.
J.Biol.Chem. 245, 3632-3636 (1970)

82. LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.:
Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen hämolytischen Anämien.
Dtsch.Med.Wschr. 86, 27-42 (1961)

83. LÖHR, G. und WALLER, H.D.:
Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathion-Reduktase-Mangel
Med.Klin. 57, 1521-1525 (1962)

4. LOSCHEN, G., GÜNZLER, W.A. und FLOHÉ, L.:
Der kinetische Mechanismus der Glutathion: H_2O_2-Oxidoreduktase.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 353, 733 (1972)

85. LUTHE, P.:
Über das Glutathion und verwandte Redoxsysteme.
Inaugural Diss. Marburg 1974

86. MAIER, R.:
Bestimmung von glykolytischen Enzymen in der Cornea.
Inaugural Diss.Marburg 1968

87. MEISTER, A.:
On the enzymology of amino acid transport.
Science 180, 33-39 (1973)

88. MILLS, G.C.:
I. Glutathione Peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.
J.Biol.Chem. 229, 189-197 (1957)

89. MILLS, G. and RANDALL, H.:
II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte.
J.Biol.Chem. 232, 589-598 (1958)

90. MILLS, G.C.:
The Purification and Properties of GlutathionePeroxidase of Erythrocytes.
J.Biol.Chem. 3, 502-506 (1959)

91. MILLS, G.C.: Glutathione Peroxidase and the Destruction of Hydrogen Peroxide in Animal Tissues. Arch.Biochem.Biophys.86,1-5 (1960)

92. NAJMAN, A., LICHTENSTEIN, H. et al.: Déficit en glutathion Peroxydase, acanthocytose et anémie hémolytique au cours d'une cirrhose. Sem.Hop.Paris 50, 3127-3130 (1974)

93. NECHELS, TH., STEINBERG, M. and CAMERON, D.: Erythrocyte Glutathione Peroxidase Deficiency. Brit. J.Haematol. 19,605-612 (1970)

94. NICHOLLS, P.: Contributions of catalase and Glutathione Peroxidase to red cell peroxid removal. Biochem.Biophys.Acta 279, 306-309 (1972)

95. NORDMANN, J.: Acquisitions récentes dans le domaine de la biologie du cristallin. Adv. Ophthal. 12, 1-258 (1962)

96. O'BRIEN, P. and FRAZER, A.: The effect of lipid peroxides on the biochemical constituents of the cell. Proc.Nutr.Soc. 25, 9-18 (1966)

97. PAGLIA, D.E. and VALENTINE, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. J.Lab.Clin.Med. 70, 158-169 (1967)

98. PAWLAK, A.L.: Inhibition of Hemoglobin-catalysed Glutathione Peroxidation and Actual Values of Glutathione Peroxidase Activity in Hereditary Deficiency of this enzyme. Klin.Wschr. 52, 645-648 (1974)

99. PIRIE, A.: Glutathione Peroxidase in lens and a source of Hydrogen Peroxid in Aqueous Humour. Biochem.J. 96, 244-253 (1965)

100. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1969

101. RAPOPORT, S.M., RADERECHT, H.J.: Physiologisch-Chemisches Praktikum. VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1972

102. REIM, M. and ASHAUER, D.: The Glutathione of the Cornea. (unveröffentlicht)

103. REIM, M., BEERMANN, H.R., LUTHE,P.: The glutathione of the cornea. Ophthal.Res. (in press)

104. REIM, M., HENNIGHAUSEN, U., HILDEBRANDT,D.,MAIER,R.: Enzyme activities in the Cornea Epithelium and Endothelium of Different Spezies. Ophthal.Res. 2, 171-182 (1971)

105. REIM, M., HEUVELS, B., CATTEPOEL, H.: The Glutathione Peroxidase in some eye tissues. Ophthal.Res. 6, 228-231 (1974)

106. REIM, M. und LICHTE, H.: Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Hornhauttrübung. Graef.Arch.Ophthal. 168, 365-377 (1965)

107. REIM, M. und MEYER, D.: Über Veränderungen von Metabolitgehalten im Corneaepithel in Anaerobiose. Albr.v.Graef. Arch.klin.exp. Ophthal. 174, 103-109 (1967)

108. REIM, M., SCHMIDT, F., MEYER, D.:
Die Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel verschiedener Säugetiere.
Ber.Dtsch.Ophthal.Ges.Heidelberg 67, 164-171 (1965)

109. REIM, M. und SCHRAMM, H.P.:
Beitrag zur biochemischen Wirkung des IUDR auf die Hornhaut.
Graef-Arch.Ophthal. 168, 185-197 (1965)

110. De REY PAILHADE: Compt.rend. 106, 1683 (1888)

111. ROTRUCK, J., POPE, A., GANTHER, H.et al.:
Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase.
Science 179, 588-590 (1973)

112. SAUNDERS, B.C., HOLMES-SIEDLE, A., STARK, B.:
Peroxidases.
Butterworths, London 1964

113. SIES, H., BÜCHER, TH., OSHINO, N., CHANCE, B.:
Heme Occupancy of Catalase in Hb-Free Perfused Rat Liver and of Isolated Rat Liver Catalase.
Arch.Biochem.Biophys. 154, 106-116 (1973)

114. SIES, H., GERSTENECKER, C., MENZEL, H. und FLOHÉ,L.:
Oxidation im Glutathion- und NADP-System und GSSG-Freisetzung in den Extrazellulärraum durch Hydroperoxide in der hämoglobinfrei durchströmten Rattenleber.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1570 (1972)

115. SMITH, P.J., TAPPEL, A.L., CHOW, C.K.:

Glutathione Peroxidase Activity as a Function of Dietary Selenomethionine.
Nature 247, 392-393 (1974)

116. SCHNEIDER, F. und FLOHÉ, L.:

Untersuchungen über die Glutathion: H_2O_2-Oxydoredutkase (Glutathion Peroxidase).
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 348, 540-552 (1967)

117. SCHWEER, G. und POOK, W.H.:

Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Biuretreaktion nach Dittebrandt-Weichselbaum für quantitative Eiweißbestimmungen in Glaskörperfiltraten.
Graef. Arch.Ophthal. 158, 387-392 (1957)

118. TAUSSKY, H.H. et al.:

Distribution of Selenium in the Tissues of the Eye.
Nature 210, 949-950 (1966)

119. WALLER, H.D., BENÖHR, H., WAUMANNS, P.:

Zur Entstehung der medikamenten-induzierten Anämie bei Glutathion-Reduktas Mangel-Trägern.
Klin.Wschr. 47, 25-30 (1969)

120. WALLER, H.D. und SCHOEN, H.D.:

Heinzkörperbildung und Glutathion-Gehalt in Erythrozyten mit G-6-P-Dehydrogenase-Mangel und Glutathion-Synthese-Störung nach Röntgenbestrahlung in vitro.
Klin.Wschr. 44, 189-194 (1966)

121. WIELAND, TH., DOSE, K., PFLEIDERER, G.:

Eine enzymatische Bestimmung des Glutathion.
Biochem.Z. 326, 442-445 (1955)

122. YAMAMOTO, Y. and TOMITA, M.:
Topical Use of Glutathione in Corneal Diseases.
Jap.J. Clin.Ophthal., Tokyo 20, 1435-1438 (1966)

123. ZELLER, E.A.: Contribution to the Enzymology of the normal and Cataractous Lens.
Amer.J.Ophthal. 36, 51-53 (1953)

124. ZIMMERMANN, R., FLOHÉ, L. et al.:
Inhibition of Lipid Peroxidation in Isolated Inner Membrane of Rat Liver Mitochondria by Superoxide Dismutase.
Febs Letters 29, 117-120 (1973)

125. ZINKHAM, W.H.: A deficient of glucose-6-phosphatdehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine sensitive erythrocytes.
Bull.Johns Hopk.Hosp. 109, 206-216 (1961)

VII E I N Z E L W E R T T A B E L L E N

Tabelle 1: Glutathion Peroxidase Aktivität im
RINDERCORNEAEPITHEL Nr. 17

(IE/g frisch) - Testkonzentration: äquimolare Einsätze von t-Bhp und GSH

0.2 mM:		0.5 mM:		1 mM:	
3.8		6.0		15.1	
3.6		6.4		15.5	
3.6	M = 3,7	7.4	M = 6.7	16.5	M = 16.0
3.9		6.8		17.1	

Tabelle 2: Glutathion Peroxidase Aktivität im RINDERCORNEAEPITHEL Nr.18

(IE/g frisch) - Testkonzentration: 0.5 mM t-Bhp und variabler GSH-Einsatz

1 mM GSH:		3 mM GSH:		4 mM GSH:	
5.8		16.1		24.8	
4.6	M = 5.4	12.3	M 15.1	26.1	M = 25.4
5.8		16.1		27.6	
2.3		16.1		23.0	

Tabelle 3: Glutathion Peroxidase Aktivität im RINDERCORNEAEPITHEL Nr. 18

(IE/g frisch) - Testkonzentration: 0.2 mM t-Bhp und variabler GSH-Einsatz

1 mM GSH:		3 mM GSH:		4 mM GSH:	
7.5		7.3		13.2	
4.6	M = 5.9	8.4	M = 9.1	10.0	M = 10.1
4.6		11.5		9.2	
7.0				11.5	

Tabelle 4: Glutathion Peroxidase Aktivität in verschiedenen Geweben vom RIND

(IE/g frisch) - Testkonzentration: 1 mM GSH, 1 mM t-Bhp -

Rindercorneaepithel:	
Nr. 17	16.0
Nr. 20	11.5
Nr. 21	9.4
Nr. 22	7.2
Nr. 23	5.0
Nr. 24	10.1
Nr. 25	3.5
Nr. 50	13.4
Nr. 56	7.6
Nr. 60	8.7

Rinderlinse:	
Nr. 1	1.5
Nr. 2	1.5
Nr. 3	3.6
Nr. 4	2.6
Nr. 5	1.5
Nr. 6	6.2
Nr. 8	1.2
Nr. 9	2.3

Rinderretina:	
Nr. 1	1.2
Nr. 2	1.8
Nr. 3	2.4
Nr. 5	3.7
Nr. 6	3.2

Tabelle 5: Glutathion Peroxidase Aktivität in verschiedenen Geweben vom SCHWEIN

(IE/g frisch) - Testkonzentration: 1 mM GSH, 1 mM t-Bhp -

Schweinecorneaepithel:		Schweinelinse:		Schweineretina:	
Nr. 6	5,4	Nr. 1	0.9	Nr. 4	0.5
Nr. 7	7.0	Nr. 2	1.3	Nr. 5	0.6
Nr. 8	7.1	Nr. 5	0.4	Nr. 6	0.4
Nr.10	3.5	Nr. 8	0.7	Nr. 7	0.8
Nr.14	5.5				
Nr.15	3.9				
Nr.16	2.2				
Nr.17	3.9				
Nr.18	5.5				
Nr.19	3.9				
Nr.20	5.2				
Nr.21	5.0				
Nr.23	2.2				

Tabelle 6: Glutathion Peroxidase
Aktivität in verschiedenen Geweben vom HUND
(IE/g frisch) - Testkonzentration: 1 mM GSH, 1 mM t-Bhp-

Hundecorneaepithel:

Nr. 1a	10.7
Nr. 1b	3.5
Nr. 2	4.2
Nr. 3	5.6
Nr. 4	3.4
Nr. 5	7.4
Nr. 6	3.6
Nr. 7	11.1
Nr. 8	9.0
Nr. 9	10.6
Nr. 11	5.8

Hundebindehaut:

Nr. 204	0.2
Nr. 205	0.3
Nr. 206	1.0
Nr. 208	0.8
Nr. 209	0.9
Nr. 211	0.3

Tabelle 7: Glutathion Peroxidase
Aktivität in verschiedenen Geweben von der KATZE
(IE/g frisch) -Testkonzentration: 1 mM GSH, 1 mM t-Bhp -

Katzencorneaepithel:

Nr. 1	2.2
Nr. 2	2.9
Nr. 3	5.5
Nr. 4	1.2
Nr. 5	7.2
Nr. 6	7.7

Katzenbindehaut:

Nr. 1	2.1
Nr. 2	1.2
Nr. 3	1.7

Tabelle 8: Glutathion Peroxidase
Aktivität in verschiedenen Geweben des KANINCHENS
(IE/g frisch)

Kaninchencorneaepithel:		Kaninchenbindehaut:	
Nr. 1	4.2	Nr. 216	4.1
Nr. 2	8.4	Nr. 217	5.3
Nr. 4	1.7	Nr. 218	4.0
Nr. 5	4.3	Nr. 219	1.7
		Nr. 220	1.4
		Nr. 221	5.5

Tabelle 9: Werte für die GSH-POD Kinetik bei variabler t-Bhp Konzentration und 1 mM GSH

RINDERCORNEAEPITHEL (IE/g frisch) Extrakteinsatz 0.05 ml

t-Bhp Konzentration in mM	0.005	0.006	0.007	0.008	0.009	0.01	0.012	0.015	0.02	1
Extrakt RCE 25			0.3		0.46	0.8 0.9		0.9		2.6
Extrakt RCE 56	0.18			0.18 0.46				0.36 0.18		8.4 7.0
Extrakt RCE 59	0.91 0.7		1.0 1.3		1.3 1.3		1.8 1.6	4.1 3.4	2.5 2.1	
Extrakt RCE 60	0.28			0.9 0.5				0.5 0.37		6.0 8.7

Tabelle 10: Werte für die GSH-POD Kinetik bei variabler t-Bhp Konzentration und 3 mM GSH

RINDERCORNEAEPITHEL (IE/g frisch) Extrakteinsatz 0.05 ml

t-Bhp Konzentration in mM	0.008	0.009	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.1	0.5
Extrakt RCE 25	0.3	0.7	0.8	1.0	-	0.9	-	-	2.8
Extrakt RCE 26	0.35	0.35	0.5	1.0	1.0	0.9	1.8	2.3	3.9

Tabelle 11: Werte für die GSH-POD Kinetik bei variabler t-Bhp Konzentration und 1 mM GSH

SCHWEINECORNEAEPITHEL (IE/g frisch) Extrakteinsatz 0.05 ml

t-Bhp Konzentration in mM	0.007	0.009	0.012	0.015	1
Extrakt SCE 9	0.26 0.22	0.5 0.3	0.7 0.8	0.8 1.0	- -
Extrakt SCE 10	1.0 0.8	1.0 -	0.7 0.85	- -	2.5 3.5
Extrakt SCE 23	0.37 0.3	0.4 0.3	- -	0.4 -	1.8 -

Tabelle 12: Werte für die GSH-POD Kinetik bei variabler t-Bhp Konzentration und 1 mM GSH

KANINCHENCORNEAEPITHEL (IE/g frisch) Extrakteinsatz 0.04 ml

t-Bhp Konzentration in mM	0.005	0.008	0.015	1
Extrakt Kan-CE 3	0.18 0.18	0.46 -	0.4 0.32	12.4 16.4
Extrakt Kan-CE 5	0.2 -	0.3 -	0.46 0.26	5.43 3.2

HUNDECORNEAEPITHEL (IE/g frisch) Extrakteinsatz 0.04 ml

t-Bhp Konzentration in mM	0.005	0.008	0.015	1
Extrakt Hu-CE 11	0.37 0.45	0.53 0.6	0.7 1.4	5.8 -

Tabelle 13: Proteingehalt in verschiedenen Geweben vom RIND

(mg/g frisch)

Rindercorneaepithel:

Nr. 16	64.1
Nr. 17	86.5
Nr. 25	51.8
Nr. 26	73.2
Nr. 49	63.4
Nr. 50	79.3

Rinderlinse:

Nr. 4	188.4
Nr. 5	203.2
Nr. 6	402.8
Nr. 7	214.9
Nr. 9	147.9
Nr.10	313.1

Rinderretina:

Nr. 1	12.8
Nr. 2	31.1
Nr. 3	15.8
Nr. 5	62.9
Nr. 6	29.4

Tabelle 14: Proteingehalt in verschiedenen Geweben vom SCHWEIN (mg/g frisch)

Schweinecorneaepithel:

Nr. 1	63.2
Nr. 3	122
Nr. 5	85.9
Nr. 11	126.3
Nr. 12	120.4
Nr. 13	116.2
Nr. 18	100.6
Nr. 19	87.1
Nr. 20	91.3

Schweinelinse:

Nr. 1	141.1
Nr. 2	143.9
Nr. 3	146.3
Nr. 4	146.2
Nr. 5	142.3
Nr. 8	141.8

Tabelle 15: Proteingehalt in verschiedenen Geweben von HUND und KATZE (mg/g frisch)

Hundecorneaepithel:

Nr. 1	32.1
Nr. 3	44.0
Nr. 5	38.0
Nr. 8	62.0
Nr. 9	56.3
Nr.10	64.9
Nr.12	77.6

Hundebindehaut:

Nr. 209	18.1
Nr. 210	12.4
Nr. 211	23.6

Katzencorneaepithel:

Nr. 1	32.6
Nr. 2	28.9
Nr. 6	65

Tabelle 16: Proteingehalt in verschiedenen Geweben vom KANINCHEN (mg/g frisch)

Kaninchencorneaepithel:		Kaninchenbindehaut:	
Nr. 1	69.6	Nr. 216	18.7
Nr. 2	71.3	Nr. 217	16.8
Nr. 3	93.1	Nr. 218	16.7
Nr. 4	61.0	Nr. 219	35.9
Nr. 5	38.6	Nr. 220	27.8

L e b e n s l a u f

*28.12.1947	in Marburg an der Lahn
1967	Abitur am Staatlichen Heinrich-Hertz-Gymnasium in Bad Godesberg
1967 - 1970	Studium der Zahnmedizin an der Albertus Magnus Universität Köln
1970	Wechsel zur Humanmedizinischen Fakultät
1971 - 1972	Klinisches Jahr am akademischen Lehrkrankenhaus Kassel
1972 - 1974	Beendigung des Studiums an der Philipps-Universität Marburg an der Lahn

Meine akademischen Lehrer waren:

in Köln:

Bauermeister, Bergmann, Debuch, Egelhaaf, Fehér, Hirsch, Huber, Jahrreiß, Jaumann, Kummer, Mies, von Minnigerode, Ortmann, Stoffel, Schneider, Tischendorf, Vogel, Voß

in Kassel:

Aust, Beckmann, Giebel, Heinecker, Janke, Kreutz, Pfau, Suchenwirth, Wepler, Wildhirt, Wolf, Wulf, Zinganell

in Marburg:

Bommer, Buchholz, Dittrich, Eschenbach, Exner, Graul, Hering, Heß, Hildebrandt, Hort, Jacob, Kaffarnick, Klaus, Kleinsasser, Koransky, Linneweh, Mannheim, Martini, Maroske, Reim, Rieken, Rohen, Siegert, Stutte, Schleyer, Willenbockel

Herr Professor Dr. med. M. R e i m
stellte das Thema und gab mir die Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten.

Herrn Professor Dr.Dr. hc. W. S t r a u b
danke ich für die Übernahme der Arbeit.

Frau Dr. L ö f f l e r, Physiologisch-Chemisches Institut II der Universität Marburg, unterstützte mich großzügig und förderte die Arbeit durch zahlreiche eingehende Gespräche.

Herr Professor S c h ä f e r vom Institut für Graphik und Malerei der Universität Marburg gab mir wertvolle Anleitungen bei der Ausführung der Graphiken.

Frau C a t t e p o l half mir jederzeit bei meiner Arbeit im Labor; Frau K u r t z, Bonn-Bad Godesberg, schrieb die Arbeit und mein Bruder Gustav fotografierte die Abbildung.

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter.